

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2000 年 12 月 28 日 (28.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 00/79275 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/53, A61K 45/00,  
39/395 // C12N 15/06, 15/12, C07K 16/28

Tokyo (JP). 澁谷正史 (SHIBUYA, Masabumi) [JP/JP];  
〒333-0866 埼玉県川口市芝5374-18-601 Saitama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03957

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,  
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) 国際出願日: 2000 年 6 月 16 日 (16.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/171709 1999 年 6 月 17 日 (17.06.1999) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醗酵  
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)  
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番  
1号 Tokyo (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 設楽研也 (SHI-  
TARA, Kenya) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町  
3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DIAGNOSTICS AND REMEDIES FOR DISEASES WITH PARTICIPATION OF MACROCYTES/MACROPHAGES

(54) 発明の名称: 単球・マクロファージが関与する疾患の診断薬および治療薬

(57) Abstract: Diagnostics and remedies for inflammatory diseases, delayed hypersensitivity, malignant tumor and arteriosclerosis which contain, as the active ingredient, a substance binding to human VEGF receptor Flt-1 or a substance inhibiting signal transduction mediated by human VEGF receptor Flt-1.

(57) 要約:

本発明は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に結合する物質またはヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質を有効成分として含有する、炎症性疾患、遅延型過敏症、悪性腫瘍、動脈硬化の診断薬および治療薬に関する。

WO 00/79275 A1

## 明 細 書

単球・マクロファージが関与する疾患の診断薬および治療薬

### 技術分野

本発明は、抗Flt-1抗体等を用いる単球、マクロファージの検出方法、および該抗体を用いる単球、マクロファージが関与する疾患の治療および診断に関する。

### 背景技術

血管新生は、脊椎動物の胎生期における循環器系の形成や多くの組織の構築に重要な役割を果たすとともに、成熟個体（雌）においても性周期における黄体形成、子宮内膜の一過性の増殖、胎盤形成などに密接に関与する。さらに、病的状態としては、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成、促進に血管新生が深く関与している [J. Biol. Chem., 267, 10931 (1992)]。血管新生を誘導する因子としては、Vascular permeability factor (VPF)/Vascular endothelial growth factor (VEGF)が上記発生段階における血管新生および病的な状態における血管新生において最も重要な因子として知られている [Advances in Cancer Research, 67, 281 (1995)]。

血管新生を伴う疾患の中で、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成にVEGFが深く関与していることが報告されている [Advances in Cancer Research, 67, 281 (1995); Endocrine Reviews, 18, 4 (1997)]。

ヒトのVEGF受容体としてはこれまでに受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する第1の受容体であるFlt-1(fms-like tyrosine kinase) [Oncogene, 5, 519 (1990); Science, 255, 989 (1992)] および第2の受容体であるKDR(kinase insert domain-containing receptor) [W092/14748; Biochem. Biophys. Res. Comm., 187, 1579 (1992)] の2種が報告されている。ヒト型VEGF受容体KDRのマウス型ホモログはFlk-1 [Proc. Natl. Acad. Science, USA, 88, 9026 (1991); W094/11499; Cell, 72, 835 (1993)] と命名されている。Flt-1およびKDR/Flk-1の細胞外ドメインは7個のイムノグロブリン様ドメインよりなり、細胞内ドメインはチロシンキナーゼドメインを有する分子量180~200キロダルトンの膜タンパクである。VEGFはFlt-1およびKDR/Flk-1にはそれぞれKd値が20 pM および75 pMで特異的に結合する。Flt-1およびKDR/Flk-1は血管内皮細胞に特異的に発現していると報告されている [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7533

(1993); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8915 (1993)]。

Flt-1の様々な疾患における発現については、ヒトグリオブラストーマ組織の腫瘍血管内皮細胞 [Nature, 359, 845(1992)]、ヒト消化器癌組織の腫瘍血管内皮細胞 [Cancer Research, 53, 4727 (1993)] で、正常組織の血管内皮細胞に比べflt-1 mRNAの発現が上昇していることが報告されている。さらに、慢性関節リュウマチ患者の関節の血管内皮細胞においてもイン・サイチュ・ハイブリダイゼーション (in situ hybridization) によりflt-1 mRNAの発現が認められることが報告されている [J. Experimental Medicine, 180, 341 (1994)]。これらの結果は、腫瘍血管新生においてVEGF-VEGFレセプターFlt-1系が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。Flt-1はVEGFが結合すると、細胞内ドメインが自己リン酸化されることが報告されているが [Science, 255, 989 (1992)]、詳しい機能については不明である。しかし、flt-1遺伝子を破壊したflt-1ノックアウトマウスは発生初期の血島形成や、それに続く血管新生において、血管内皮細胞の形態異常により血管構築が異常となり胎生8.5～9.5日齢で死亡することから、Flt-1は血管新生における血管内皮細胞の管腔形成に必須の機能を果たしていると推定されている [Nature, 376, 66 (1995)]。

VEGFは血管内皮細胞に選択性の高い増殖因子であるが、マウスの単球に作用し、単球の遊走を促進する活性を有することが報告されている [Journal of Experimental Medicine, 172, 1535, (1990)]。また、VEGFはヒト末梢血より調製した単球に対しても遊走促進活性を示すこと [Blood, 81, 2767 (1993)]、VEGF中和抗体により遊走促進活性が阻害されることが報告されている [Blood, 87, 3336 (1996)]。ヒト末梢血より調製した単球をノーザンブロット法およびRT-PCR法によりmRNAレベルでVEGFレセプターの発現を解析するとFlt-1は発現しているが、KDRは発現していないことから、Flt-1は単球の遊走に関わるレセプターであると推定されている [Journal of Biological Chemistry, 271, 17629 (1996)]。

ヒト単球をリポポリサッカライドで活性化するとFlt-1のmRNAレベルでの発現が上昇することが報告されている [Blood, 87, 3336 (1996)]。

単球は、健常人の末梢血の全白血球の5～6%を占める。血中の単球は直径10～20 $\mu$ mの大型の細胞であり、活発な遊走能で末梢血中を循環しているが、一方では血管壁を通して種々の器官や組織内へと移動して、そこでより大型で分

化したマクロファージになる。単球およびマクロファージは生理的には、微生物、細胞崩壊物などを貪食、消化することによって防衛機能を担っており、共通の起源、分化、細胞構造、豊富なリソソーム、貪食能を示すことから、単球—マクロファージ群として一括されている〔マクロファージ：徳永徹著 講談社(1986)、新病理学各論：菊池浩吉、吉木敬編 南山堂(1996)〕。単球—マクロファージ群は、炎症疾患、遅延型過敏症、悪性腫瘍、動脈硬化等の疾患局所に浸潤しており、これら疾患の進展に関与している〔マクロファージ：徳永徹著 講談社(1986)、新病理学各論：菊池浩吉、吉木敬編 南山堂(1996)〕。

炎症性疾患である慢性関節リュウマチにおいては、病変部である滑膜は健康人に比べ肥厚し、マクロファージが増加している。リュウマチ滑膜における滑膜マクロファージ（以下、リュウマチ滑膜における滑膜マクロファージをRA滑膜マクロファージと記する）は主に血中の単球から遊走してきたものである。RA滑膜マクロファージは、炎症反応を促進する種々のサイトカイン、タンパク質分解酵素、活性酸素、一酸化窒素、プロスタグランジンE2などを産生し、周囲の細胞を活性化、および障害を引き起こしたり、細胞外マトリクスの変性を引き起こす。RA滑膜マクロファージが産生する炎症を促進するサイトカインとしては、インターロイキン- $1\beta$ （以下、インターロイキンをILと記する）、IL-6、IL-8、IL-10、IL-15、MCP-1 (monocyte chemotactic protein)、MIP- $1\alpha$  (macrophage inflammatory protein)、TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、PDGF (platelet-derived growth factor) 等が知られている〔臨床免疫, 30, 214 (1998)〕。

動脈硬化においては、マクロファージは病変形成の初期段階より病変部に存在しており病態の進展に関与している。血中の単球は初期の病変部の血管内皮細胞に結合し、内皮下の血管壁へ遊走し、マクロファージへと分化する。血管壁に集まったマクロファージは変性LDLを細胞内に取り込み泡沫化に至り、動脈硬化病変を形成する。病巣のマクロファージは、病態を促進するVEGF、PDGF、FGF (fibroblast growth factor)、IL-1など種々のサイトカインを産生する〔最新医学, 53, 88 (1998)〕。

以上のように、末梢血より調製した単球でmRNAレベルでVEGF受容体Flt-1が発現していること、単球はVEGF依存的に遊走が促進することが報告されている。しかし、単球細胞表面上にFlt-1が発現していること、さらに、単球がFlt-1を介してVEGF依存的に遊走するかどうかは明らかでない。また、VEGF依存的な単

球の遊走を阻害することができるFlt-1を介する情報伝達を阻害する物質は知られていない。

#### 発明の開示

単球・マクロファージ系細胞が関与する炎症性疾患、遅延型過敏症、悪性腫瘍、動脈硬化を診断および治療するための有用な方法が求められている。

本発明者らは、VEGF受容体Flt-1（以下、Flt-1と略記することもある。）に対する抗体（以下、抗Flt-1抗体と略記することもある。）がヒト健常人末梢血の単球に反応すること、ヒト臍帯血の血液幹細胞には抗Flt-1抗体は反応しないが、血液幹細胞より分化した単球には抗Flt-1抗体が反応すること、また抗Flt-1抗体がVEGFにより誘導される単球の遊走を阻害することを初めて見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は以下の（１）～（６５）に関する。

（１） ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質を有効成分として含有する、造血幹細胞から単球・マクロファージへの分化を検出する試薬。

（２） ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質が、ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体である上記（１）記載の試薬。

（３） ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である上記（２）記載の試薬。

（４） モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト化抗体、またはそれらの抗体断片から選ばれる抗体である上記（３）記載の試薬。

（５） ハイブリドーマが産生する抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748およびKM1750からなる群より選ばれる抗体である上記（４）記載の試薬。

（６） ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域移植抗体から選ばれる抗体である上記（４）記載の試薬。

（７） ヒト型キメラ抗体が、KM2532またはKM2550である上記（６）記載の試薬。

（８） ヒト型相補性決定領域抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554およびKM8555からなる群より選ばれる抗体である上記（６）記載の試薬。

（９） 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化Fvおよび相補性決定領域を含むペプチドからなる群より選ばれる抗体断片である上記（４）記載の試薬。

(10) 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である上記(2)～(9)いずれか1項に記載の試薬。

(11) ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質を用いて、造血幹細胞から単球・マクロファージへの分化を検出する方法。

(12) ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質が、ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体である上記(11)記載の方法。

(13) ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることを特徴とする上記(12)記載の方法。

(14) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト化抗体、またはそれらの抗体断片から選ばれる抗体である上記(13)記載の方法。

(15) ハイブリドーマが産生する抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748およびKM1750からなる群より選ばれる抗体である上記(14)記載の方法。

(16) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域移植抗体から選ばれる抗体である上記(14)記載の方法。

(17) ヒト型キメラ抗体が、KM2532またはKM2550である上記(16)記載の方法。

(18) ヒト型相補性移植移植抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554およびKM8555からなる群より選ばれる抗体である上記(16)記載の方法。

(19) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化Fvおよび相補性決定領域を含むペプチドからなる群より選ばれる抗体断片である上記(14)記載の方法。

(20) 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である上記(12)～(19)のいずれか1項に記載の方法。

(21) ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質を有効成分として含有する単球・マクロファージが関与する疾患の診断薬。

(22) 単球・マクロファージが関与する疾患が、炎症性疾患、遅延型過敏症、動脈硬化または悪性腫瘍である上記(21)記載の診断薬。

(23) ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質が、ヒトVEG

F受容体Flt-1に対する抗体である上記（21）記載の診断薬。

（24） ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である上記（23）記載の診断薬。

（25） モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト化抗体、またはそれらの抗体断片から選ばれる抗体である上記（24）記載の診断薬。

（26） ハイブリドーマが産生する抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748およびKM1750からなる群より選ばれる抗体である上記（25）記載の診断薬。

（27） ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域移植抗体から選ばれる抗体である上記（25）記載の診断薬。

（28） ヒト型キメラ抗体が、KM2532またはKM2550である上記（27）記載の診断薬。

（29） ヒト型相補性決定領域移植抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554およびKM8555からなる群より選ばれる抗体である上記（27）記載の診断薬。

（30） 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化Fvおよび相補性決定領域を含むペプチドからなる群から選ばれる抗体断片である上記（25）記載の診断薬。

（31） 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である上記（23）～（30）のいずれか1項に記載の診断薬。

（32） ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質を有効成分として含有する、単球・マクロファージが関与する疾患の診断方法。

（33） 単球・マクロファージが関与する疾患が、炎症性疾患、遅延型過敏症、動脈硬化または悪性腫瘍である上記（32）記載の診断方法。

（34） ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質がヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体である上記（32）記載の診断方法。

（35） ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である上記（34）記載の診断方法。

（36） モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト化抗体、またはそれらの抗体断片から選ばれる抗体である上記（35）記載

の診断方法。

(37) ハイブリドーマが産生する抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748およびKM1750からなる群より選ばれる抗体である上記(36)記載の診断方法。

(38) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域移植抗体から選ばれる抗体である上記(36)記載の診断方法。

(39) ヒト型キメラ抗体が、KM2532またはKM2550である上記(38)記載の診断方法。

(40) ヒト型相補性決定領域移植抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554およびKM8555からなる群より選ばれる抗体である上記(38)記載の診断方法。

(41) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化Fvおよび相補性決定領域を含むペプチドからなる群から選ばれる抗体断片である上記(36)記載の診断方法。

(42) 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である、上記(34)～(41)のいずれか1項に記載の診断方法。

(43) ヒトVEGF受容体Flt-1を介する情報伝達を阻害する物質を有効成分として含有する、単球・マクロファージの遊走阻害剤。

(44) ヒトVEGF受容体Flt-1を介する情報伝達を阻害する物質がVEGFのFlt-1受容体への結合を阻害する物質、またはFlt-1受容体からの情報伝達を阻害する物質である上記(43)記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

(45) VEGFのFlt-1受容体への結合を阻害する物質が、ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体である上記(44)記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

(46) ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である上記(45)記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

(47) ヒトVEGF受容体Flt-1に対するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト化抗体、またはそれらの抗体断片から選ばれる抗体である、上記(46)記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

(48) ハイブリドーマが産生する抗体が、KM1732、KM1748およびKM1750



から選ばれる抗体である上記（４７）記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

（４９） ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域移植抗体から選ばれる抗体である上記（４７）記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

（５０） ヒト型キメラ抗体が、KM2532またはKM2550である上記（４９）記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

（５１） ヒト型相補性決定領域移植抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554およびKM8555からなる群より選ばれる抗体である上記（４９）記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

（５２） 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化Fvおよび相補性決定領域を含むペプチドからなる群より選ばれる抗体である上記（４７）記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

（５３） 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である上記（４５）～（５２）のいずれか１項に記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

（５４） ヒトVEGF受容体Flt-1を介する情報伝達を阻害する物質を有効成分として含有する単球・マクロファージが関与する疾患の治療薬。

（５５） 単球・マクロファージが関与する疾患が、炎症性疾患、遅延型過敏症、動脈硬化または悪性腫瘍である上記（５４）記載の治療薬。

（５６） ヒトVEGF受容体Flt-1を介する情報伝達を阻害する物質がVEGFのFlt-1受容体への結合を阻害する物質、またはFlt-1受容体からの情報伝達を阻害する物質である上記（５５）記載の治療薬。

（５７） VEGFのFlt-1受容体への結合を阻害する物質が、ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体である上記（５６）記載の治療薬。

（５８） ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である上記（５７）記載の治療薬。

（５９） ヒトVEGF受容体Flt-1に対するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト化抗体、またはそれらの抗体断片から選ばれる抗体である、上記（５８）記載の治療薬。

（６０） ハイブリドーマが産生する抗体が、KM1732、KM1748およびKM1750から選ばれる抗体である上記（５９）記載の治療薬。

(61) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域移植抗体から選ばれる抗体である上記(59)記載の治療薬。

(62) ヒト型キメラ抗体が、KM2532またはKM2550である上記(61)記載の治療薬。

(63) ヒト型相補性決定領域移植抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554およびKM8555からなる群より選ばれる抗体である上記(61)記載の治療薬。

(64) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化Fvおよび相補性決定領域を含むペプチドからなる群より選ばれる抗体である上記(59)記載の治療薬。

(65) 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である上記(57)～(64)のいずれか1項に記載の治療薬。

造血幹細胞は、全ての血液細胞に分化できる多分化能、および自分自身を複製する自己再生能を兼ね備えた細胞である。造血幹細胞は、骨髓系幹細胞またはリンパ系幹細胞に分化する。骨髓系の幹細胞からは、赤血球系、顆粒球系、単球-マクロファージ系、好酸球系、好塩基球系ならびに骨髓巨核球-血小板系の細胞が分化する。リンパ系幹細胞からは、T細胞系、B細胞系が分化する。単球・マクロファージは、単球は、健常人の末梢血の全白血球の5～6%を占める。血中の単球は直径10～20 $\mu$ mの大型の細胞であり、活発な遊走能を有して末梢血中を循環している。一方で、血管壁を通して種々の器官や組織内へと移動して、そこでより大型で分化したマクロファージになる。単球およびマクロファージは共に、生理的には、生体内の微生物、細胞崩壊物などを貪食、消化することによって防衛機能を担っており、また共通の起源、分化、細胞構造、豊富なリソソーム、貪食能をも示すことから、単球-マクロファージ群として一括されている[マクロファージ：徳永徹著 講談社(1986)、新病理学各論：菊池浩吉、吉木敬編 南山堂(1996)]。単球-マクロファージ群は、炎症疾患、遅延型過敏症、悪性腫瘍、動脈硬化等の疾患局所に浸潤しており、これら疾患の進展に関与している[マクロファージ：徳永徹著 講談社(1986)、新病理学各論：菊池浩吉、吉木敬編 南山堂(1996)]。

本発明で用いられる造血幹細胞から単球・マクロファージの分化を検出する試薬としては、造血幹細胞で発現しないが、単球・マクロファージで発現する

蛋白質に対して結合活性を有する物質であればいかなるものでもよい。例えば、造血幹細胞で発現しないが、単球・マクロファージで発現する蛋白質として、Flt-1があげられ、造血幹細胞から単球・マクロファージへの分化を検出する試薬として、抗Flt-1抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体などがあげられる。

単球・マクロファージが関与する疾患の診断薬または診断方法に用いる物質としては、Flt-1に対して結合活性を有する物質であればいかなるものでもよいが、好適にはFlt-1に対する抗体、該抗体断片およびそれらの誘導体等をあげることができる。

単球・マクロファージが関与する疾患の治療薬または単球・マクロファージの遊走阻害剤としては、Flt-1を介する情報伝達を阻害する物質であればいかなるものでもよい。Flt-1を介する情報伝達を阻害する物質としては、Flt-1の機能を阻害できる物質であればいかなるものでもよいが、ヒトVEGFのFlt-1への結合を阻害する物質、またはFlt-1からの情報伝達を阻害する物質などがあげられる。

ヒトVEGFのFlt-1への結合を阻害する物質としては、抗Flt-1抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体などがあげられるが、好ましくはFlt-1に対する中和抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体を用いられる。Flt-1からの情報伝達を阻害する物質としては、Flt-1のシグナル伝達を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤、例えばSB203580[Oncogene, 15, 2169 (1997)]などのp38阻害剤などがあげられる。

本発明の単球・マクロファージが関与する疾患としては、炎症性疾患、遅延型過敏症、動脈硬化または悪性腫瘍などがあげられる。炎症性疾患としては、慢性関節リュウマチ、若年性慢性関節炎、全身性硬化症、自己免疫性甲状腺疾患、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎などがあげられる。遅延型過敏症としては、接触性皮膚炎などがあげられる。動脈硬化としては、粥状硬化などがあげられる。悪性腫瘍としては、メラノーマ、乳癌、脳腫瘍などがあげられる。

本発明で使用される抗Flt-1抗体は、公知の手段[アンティボディー・ア・ラボラトリー・マニュアル、コールド・スプリングハーバー・ラボラトリー (Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、以下、アンチボディー・ア・ラボラトリー・マニュアルと記す]を用いてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。

本発明で使用する抗Flt-1抗体として、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれも用いることができるがモノクローナル抗体が好ましい。

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより産生される抗体、および、抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体をあげることができる。

本発明で使用するハイブリドーマにより産生される抗体としては、ヒトVEGF受容体Flt-1タンパク質を抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性をもつ形質細胞を誘導し、さらに、それと骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより取得された、抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体をあげることができる。

本発明で使用する遺伝子組換え抗体としては、上記本発明のモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものがあげられ、ヒト化抗体などをあげることができる。該抗体において、抗原性が低く、血中半減期の延長されたものは、治療薬として好ましい。

本発明で使用するヒト化抗体は、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域 (complementary determining region; 以下、CDRと略記する。) 移植抗体を包含する。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体可変領域重鎖 (以下、VHと称す) および可変領域軽鎖 (以下、VLと称す) とヒト抗体の定常領域重鎖 (以下、CHと称す) およびヒト抗体の定常領域軽鎖 (以下、CLと称す) とからなる抗体を意味する。

本発明で使用するヒト型キメラ抗体は、Flt-1に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト抗体に、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRをヒト以外の動物の抗体のCDR配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。

本発明で使用するヒト型CDR移植抗体は、Flt-1に結合する、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列で任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列を

それぞれ置換したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

本発明で使用されるヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体のヒト抗体部分はいずれのイムノグロブリン(Ig)クラスに属するものでもよいがIgG型のものが好適であり、IgG型に属するIgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のイムノグロブリンのC領域のいずれも用いることができる。

本発明で使用される抗体断片は、Flt-1に対して結合性を示す抗体断片であるFab (Fragment of antigen bindingの略)、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体(single chain Fv; 以下、scFと称す)およびジスルフィド安定化抗体(disulfide stabilized Fv; 以下、dsFvと称す)およびCDRを含むペプチドを含有する。

Fabは、IgGのヒンジ領域で2本のH鎖を架橋している2つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パパイニンで分解して得られた、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体で構成された、分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明で使用されるFabは、抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体をパパイニン処理して得ることができる。または、該抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体のFabをコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

Fab'は、上記F(ab')<sub>2</sub>のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明で使用されるFab'は、抗Flt-1抗体を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗Flt-1抗体のFab'をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することができる。

F(ab')<sub>2</sub>は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明で使用されるF(ab')<sub>2</sub>は、抗Flt-1抗体をトリプシン処理して得ることができる。または、該抗Flt-1抗体のF(ab')<sub>2</sub>をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、F(a

b')<sub>2</sub>を製造することができる。

一本鎖抗体 (scFv) は、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと称す）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドを示す。本発明で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLは、抗Flt-1モノクローナル抗体であればいかなるものでもよい。

本発明で使用される一本鎖抗体は、Flt-1に結合する抗体を生産するハイブリドーマよりVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、一本鎖抗体発現ベクターを構築し、大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

ジスルフィド安定化抗体 (dsFv) は、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法 [Protein Engineering, 7, 697 (1994)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明で使用されるジスルフィド安定化抗体に含まれるVHあるいはVLは、抗Flt-1モノクローナル抗体であればいかなるものでもよい。

本発明で使用されるジスルフィド安定化抗体は、ヒトVEGF受容体Flt-1に反応する抗体を生産するハイブリドーマよりVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、適当な発現ベクターに挿入してジスルフィド安定化抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ導入し発現させることにより製造することができる。

CDRを含むペプチドは、H鎖またはL鎖CDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

本発明で使用されるCDRを含むペプチドは、ヒトVEGF受容体Flt-1に特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得した後、CDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDRを含むペプチドを製造することができる。

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によって製造することもできる。

本発明の抗体の誘導体は、本発明のハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体またはそれらの抗体断片に放射性同位元素、蛋白質または低分子の化合物などを結合させた抗体に関する。

本発明で使用される上記抗体または該抗体断片に、放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤などを、化学的または遺伝子工学的に結合させた結合抗体も抗体の誘導体として使用することができる。

該結合抗体は、ヒトVEGF受容体Flt-1に結合する抗体に放射性同位元素、蛋白質あるいは低分子の薬剤などを化学的に結合させることにより製造することができる。また、蛋白質との結合抗体については、抗体をコードするcDNAに蛋白質をコードするcDNAを連結させ、適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを大腸菌、酵母、あるいは動物細胞に発現させることにより製造することができる。

本発明で使用されるモノクローナル抗体は、ヒトVEGF受容体Flt-1に結合すればいかなるものでもよいが、以下に述べる製造法によって確立したものが好適なものとしてあげられる。以下に、抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体の作製方法について説明する。

#### 1. 抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体の作製方法

##### (1) 抗原の調製

抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体を作製するために必要な抗原としては、ヒトVEGF受容体Flt-1を細胞表面に発現した細胞あるいはその細胞膜画分、または、アミノ酸の長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1蛋白質あるいは該蛋白質と抗体のFc部分との融合蛋白質などがあげられる。

ヒトVEGF受容体Flt-1を細胞表面に発現する細胞としては、NIH3T3-Flt-1細胞 [Cell Growth & Differentiation, 7, 213 (1996)] があげられる。長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1蛋白質あるいは該蛋白質と抗体のFc部分との融合蛋白質として発現させる方法としては、ヒトVEGF受容体Flt-1をコードする全長あるいはその部分断片cDNA [Cell Growth & Differentiation, 7, 213 (1996)] を適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組み換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより得られたヒトVEGF受容体Flt-1発現細胞を、適当な培地中で培養することにより細胞内あるいは培養上清中にヒトVEGF受容体Flt-1の全長あるいは部分断片をそのままあ

るいは融合蛋白質として生産することができる。また、上述の蛋白質の部分配列を有するポリペプチドをアミノ酸合成機を用いて合成することによっても調製することができる。

宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のエシェリヒア属、バチルス属等の細菌が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Sf9、Sf21 (ファーマーミンジェン社製)、High Five (インビトロジェン社製) 等が例示される。

本発明のDNAを導入するベクターとしては、該DNAを組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。

細菌、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましいが、例えば、市販のpGEX (ファルマシア社製)、pET システム (ノバジェン社製) などが例示される。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., US A, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394) 等、いずれの方法も用いられる。

酵母を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p 1 3 (ATCC37115)、YE p 2 4 (ATCC37051)、YC p 5 0 (ATCC37419) 等が用いられる。

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)] 等、いずれの方法も用いられる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pA



GE 107 [特開平3-22979, Cytotechnology, 3, 133 (1990)] , PAGE 103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987) ] 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE(immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)] 等、いずれの方法も用いられる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サプリメント1～34 (Current Protocols in Molecular Biology Supplement 1-34)、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus Expression Vectors A Laboratory Manual) 等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得たのち、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質発現昆虫細胞を取得する。

遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等が用いられる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) などが用いられる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)] 等が用いられる。

また、ファーミンジェン社製バキュロゴールドスターターキットなどを用いて組み換えバキュロウイルスを作製したのち、前述したSf9、Sf21あるいはHig

h Five等の昆虫細胞に該組み換えウィルスを感染させることにより蛋白質を生産させることもできる [Bio/Technology, 6, 47(1988)]。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産、融合蛋白質発現等が開発されており、いずれの方法も用いることができる。例えば、モレキュラー・クローニング 第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリー・プレス [Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989); 以下、「モレキュラー・クローニング 第2版」と記す] に記載されている方法に準じて行うことができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ヒトVEGF受容体Flt-1の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい (モレキュラー・クローニング 第2版)。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下、15~40℃で16~96時間行う。培養期間中、pHは3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。培養中は必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下、35~37℃で3~7日間行い、培養中は必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [ファーミンジェン (Pharmlngen) 社製]、Sf900I ISFM [ライフテクノロジーズ (Life Technologies) 社製]、ExCell400、ExCell405 [いずれもJRH バイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製] 等が用

いられる。培養は、25～30℃で1～4日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記において、動物細胞および昆虫細胞の培養において可能であれば、ヒトVEGF受容体Flt-1の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質の精製を容易にするため、血清無添加の培地を用いることが好ましい。

ヒトVEGF受容体Flt-1の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として宿主細胞内に蓄積された場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん濁後、超音波法、フレンチプレス法などにより細胞を破碎し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、タンパク質の立体構造を形成させることができる。

ヒトVEGF受容体Flt-1の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として細胞外に分泌された場合には、培養上清中に発現蛋白質を回収することができる。

単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。

あるいは、部分配列を有するポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易（米国Advanced chemTech社製）、パーキンエルマージャパン（米国Perkin-Elmer社製）、アロカ（米国Protein Technology Instrument社製）、クラボウ（米国Synthecell-Vega社製）、日本パーセプティブ・リミテッド（米国PerSeptive社製）、島津製作所等のペプチド合成機を用いても製造することができる。

また、上述の蛋白質の部分配列を有するポリペプチドをアミノ酸合成機を用いて合成することによっても調製することができる。

## （2）動物の免疫と抗体産生細胞の調製

上記で得られた該蛋白質を抗原として動物を免疫する。免疫する方法として

は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に抗原をそのまま投与してもよいが、抗原性の高いキャリアタンパク質を抗原に結合させて投与する、あるいは適当なアジュバントとともに抗原を投与することが好ましい。

キャリアタンパク質としては、スカシガイヘモシアニン、キーホールリンペットヘモシアニン、牛血清アルブミン、牛チログロブリン等があげられ、アジュバンドとしては、フロインドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチン等があげられる。

免疫動物としては、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスターなどの非ヒト哺乳動物があげられる。

抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間毎に3～10回行う。抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 $\mu$ gが好ましい。各投与後、3～7日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、該血清の抗原との反応性について、酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊(1976年)〕などで確認する。

そして、該血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物を、抗体産生細胞の供給源とする。

抗原の最終投与後3～7日目に、免疫動物より公知の方法(アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル)に準じてリンパ球を摘出し、リンパ球と骨髓腫細胞とを融合させる。

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒト哺乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該細胞を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

抗体産生細胞は、抗原投与された非ヒト哺乳動物の脾細胞、リンパ節、末梢血などから採取する。

### (3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Na

ture, 256, 495 (1975)] など、イン・ビトロ (in vitro) で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法 (アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル) に従い、細胞融合時までに  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

#### (4) 細胞融合とモノクローナル抗体の選択

上記で得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄には MEM 培地または PBS (リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水 1 リットル、pH 7.2) などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT 培地 {正常培地 [RPMI-1640 培地にグルタミン (1.5mM)、2-メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-6}$ M)、ジェンタマイシン (10  $\mu$ g/ml) および牛胎児血清 (FCS) (CSL 社製、10%) を加えた培地] にヒポキサンチン ( $10^{-4}$ M)、チミジン ( $1.5 \times 10^{-6}$ M) およびアミノプテリン ( $4 \times 10^{-7}$ M) を加えた培地} を用いる。

培養後、培養上清の一部をとり、下記酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

#### 酵素免疫測定法

抗原蛋白質あるいは抗原蛋白質を発現した細胞などをプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。

第二抗体とは、第一抗体を認識できる抗体に、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識したものである。具体的には、ハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行い、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

抗 Flt-1 モノクローナル抗体の具体例としては、W098/22616 に記載されているハイブリドーマ KM1732 (FERM BP-5698) が生産するマウス IgG1 サブクラスに属す

るモノクローナル抗体KM1732、ハイブリドーマKM1730(FERM BP-5697)が生産するマウスIgG2bサブクラスに属するモノクローナル抗体KM1730、ハイブリドーマKM1731(FERM BP-5718)が生産するマウスIgG2aサブクラスに属するモノクローナル抗体KM1731、ハイブリドーマKM1748(FERM BP-5699)が生産するマウスIgG2bサブクラスに属するモノクローナル抗体KM1748、および、ハイブリドーマKM1750(FERM BP-5700)が生産するマウスIgG2bサブクラスに属するモノクローナル抗体KM1750などがあげられる。

上記記載のハイブリドーマ産生モノクローナル抗体のうち、KM1732、KM1748およびKM1750は、Flt-1に対する中和活性を有しており、単球・マクロファージの遊走阻害剤または単球・マクロファージに関与する疾患の治療薬として好ましい。

#### (5) モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を培養して得られる培養液、またはプリスタン処理〔2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン(Pristane)0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を腹腔内投与して腹水癌化させた腹水から、分離、精製することにより調製できる。

モノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて行う方法があげられる。この方法により、IgGあるいはIgM画分を回収し、精製モノクローナル抗体を取得することができる。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、モノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4があげられるが、特にマウスIgG1、IgG2a、ヒトIgG1タイプは、補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC活性）および抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC活性）を有し、治療への応用上、有用である。

#### 2. 遺伝子組換え抗体の作製方法 (1) -抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト化抗体

## の作製方法

### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト以外の動物の抗体からヒト化抗体を作製するために必要なヒト化抗体発現用ベクターを構築する。ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のC領域であるCHおよびCLをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子をそれぞれ挿入することにより構築されたものである。

ヒト抗体のC領域としては、例えば、ヒト抗体H鎖ではC $\gamma$ 1やC $\gamma$ 4、ヒト抗体L鎖ではC $\kappa$ 等の任意のヒト抗体のC領域を用いることができる。ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンより成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体C領域をコードする遺伝子を組込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。

例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 1527 (1981)]、pSG1 $\beta$ d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)]等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR プロモーターとエンハンサー [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)]、および免疫グロブリンH鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)]とエンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)]等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖、L鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（タンデム型）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のし易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスがとれる等の点でタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]。

### (2) ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得する。

抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体を産生する細胞、例えば、マウス

ヒトVEGF受容体Flt-1抗体産生ハイブリドーマ等よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAを、ファージあるいはプラスミドなどのベクターに挿入し、cDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のC領域部分あるいはV領域部分をプローブとして用い、VHをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、およびVLをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換えプラスミド上の目的とする抗体のVHおよびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

### (3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

前記2(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、キメラ抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流にあらかじめヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニングするための制限酵素の認識配列を設けておき、このクローニングサイトをヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAを下記に述べる合成DNAを介して挿入することにより、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを製造することができる。合成DNAは、ヒト以外の動物の抗体のV領域の3'末端側の塩基配列とヒト抗体のC領域の5'末端側の塩基配列とからなるものであり、両端に適当な制限酵素部位を有するようにDNA合成機を用いて製造する。

### (4) ヒト以外の動物の抗体のCDR 配列の同定

抗体の抗原結合部位を形成するVH及びVLは、配列の比較的保存された4個のフレームワーク領域（以下、FR領域と称す）とそれらを連結する配列の変化に富んだ3個の相補性決定領域（CDR）から成っている[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]。そして各CDR アミノ酸配列（CDR 配列）は、既知の抗体のV領域のアミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991, 以下、「シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト」と記す。]と比較することにより同定



することができる。

#### (5) ヒト型CDR 移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR 移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

まず、目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDR を移植するためのヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列をVH、VLそれぞれについて選択する。ヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のV領域のFRのアミノ酸配列であればいかなるものでも用いることができる。

例えば、Protein Data Bank に登録されているヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のV 領域のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列（シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）があげられるが、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を創製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列と高い相同性、好ましくは65%以上の相同性を有することが望ましい。次に、選択したヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列をコードするDNA配列と目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDRのアミノ酸配列をコードするDNA配列を連結させて、VH、VLそれぞれのアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。CDR移植抗体可変領域遺伝子を構築するために設計したDNA配列を得るためには、全DNA配列をカバーするように各鎖について数本の合成DNAを設計し、それらを用いてポリメラーゼ・チェーン・リアクション（Polymerase Chain Reaction；以下、PCRと記す）を行う。PCRでの反応効率および合成可能なDNA の長さから各鎖について、好ましくは、6本の合成DNA を設計する。反応後、増幅断片を適当なベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定し、目的のヒト型CDR移植抗体の各鎖のV領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドを取得する。また、約100塩基よりなる合成DNAを用いてセンス、アンチセンスともに全配列を合成し、それらをアニーリング、連結することで、目的のヒト型CDR 移植抗体の各鎖のV領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを構築することもできる。

#### (6) ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDRのみをヒト抗体のV領域のFR間に、単純に移植しただけでは、その活性はもとのヒト以外の動物の抗体の活性に比べて低下してしまうことが知られている [Bio/Technology, 9, 266 (1991)]。そこでヒト抗体のV 領域のFRのアミノ酸配列のうち、直

接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用をしているアミノ酸残基、あるいは抗体の立体構造の維持に関与している等の可能性を有するアミノ酸残基をもとのヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、活性を上昇させることが行われている。そして、それらのアミノ酸残基を効率よく同定するため、X線結晶解析あるいはコンピューターモデリング等を用いた抗体の立体構造の構築および解析を行っている。しかし、いかなる抗体にも適応可能なヒト型CDR移植抗体の製造法は未だ確立されておらず、現状では個々の抗体によって種々の試行錯誤が必要である。

選択したヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列の改変は各種の変異導入プライマーを用いて前記2(5)に記載のPCRを行うことにより達成できる。PCR後の増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むベクター（以下、アミノ酸配列改変ベクターと称す）を取得する。

また、狭い領域のアミノ酸配列の改変であれば、20～35塩基からなる変異導入プライマーを用いたPCR変異導入法により行うことができる。具体的には、改変後のアミノ酸残基をコードするDNA配列を含む20～35塩基からなるセンス変異プライマー及びアンチセンス変異プライマーを合成し、改変すべきV領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドを鋳型として2段階のPCRを行う。最終増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むアミノ酸配列改変ベクターを取得する。

#### (7) ヒト型CDR 移植抗体発現ベクターの構築

前記2(1)のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子上流に、前記2(5)および2(6)で取得したヒト型CDR移植抗体のVH及びVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト型CDR移植抗体のVH及びVLのアミノ酸配列をコードするcDNAを構築するためのPCRの際に5'末端および3'末端の合成DNAの末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、所望のヒト抗体のC領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入することができる。

#### (8) ヒト化抗体の一過性（トランジェント）発現および活性評価

多種類のヒト化抗体の活性を効率的に評価するために、前記2(3)のヒト

型キメラ抗体発現ベクター、および前記 2 (7) のヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターあるいはそれらの改変ベクターを COS-7 細胞 (ATCC CRL1651) に導入してヒト化抗体の一過性発現 [Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, p.283, 1991] を行い、その活性を測定することができる。

COS-7 細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE- デキストラン法 [Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, p.283, 1991]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等があげられる。

ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の活性は前記 1 (5) に記載の酵素免疫測定法 (ELISA 法) 等により測定することができる。

#### (9) ヒト化抗体の安定 (ステーブル) 発現および活性評価

前記 2 (3) のヒト型キメラ抗体発現ベクターおよび前記 2 (7) のヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平 2-257891, Cytotechnology, 3, 133 (1990)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウス SP2/0-Ag14 細胞 (ATCC CRL1581)、マウス P3X63-Ag8.653 細胞 (ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、DHFR 遺伝子と称す) が欠損した CHO 細胞 [Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 4216 (1980)]、ラット YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC CRL1662、以下、YB2/0 細胞と称す) 等があげられる。

ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 および FCS を含む RPMI1640 培地により選択する。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養液中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養液中のヒト化抗体の活性は前記 1 (5) に記載の方法などにより測定する。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、DHFR 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる [アンチボディズ (Antibodies), A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988 ; 以下、「アンチボディズ」]

と記す]。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる精製方法を使用することができ。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組合せて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) [Nature, 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 (アンチボディズ, Chapter 12, 1988) 等で測定する。

精製したヒト化抗体の反応性、また、ヒト化抗体のVEGFに対する阻害活性の測定は前記1(4)に記載の方法などにより測定することができる。

Flt-1に対するヒト化抗体の具体例としては、参考例により作製されるヒト型キメラ抗体であるKM2532、KM2550等、ヒト型CDR移植抗体であるKM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555等があげられる。

上記抗体の可変領域をコードするDNAを含有したプラスミドを導入した大腸菌としては、例えば、ヒト型キメラ抗体については、KM2532のH鎖可変領域DNAを有する大腸菌XL1-Blue MRF'/KM1732HA2 (FERM BP-6354)、KM2532のL鎖可変領域DNAを有する大腸菌XL1-Blue MRF'/KM1732L2-1 (FERM BP-6352)、KM2550のH鎖可変領域DNAを有する大腸菌XL1-Blue MRF'/KM1750H2-1 (FERM BP-6353) およびKM2550のL鎖可変領域DNAを有する大腸菌XL1-Blue MRF'/KM1750L3-1 (FERM BP-6355) などがあげられる。

上記抗体の可変領域をコードするDNAを含有したプラスミドを導入した大腸菌としては、例えば、ヒト型CDR移植抗体については、KM8550、KM8551およびKM8554のH鎖可変領域DNAを有する大腸菌DH5 $\alpha$ /pHKM1750HV0 (FERM BP-6719)、KM8552、KM8553およびKM8555のH鎖可変領域DNAを有する大腸菌DH5 $\alpha$ /pHKM1750HV3 (FERM BP-6720)、KM8550およびKM8552のL鎖可変領域DNAを有する大腸菌 (FERM BP-6716)、KM8551およびKM8553のL鎖可変領域DNAを有する大腸菌 (FERM BP-6717)、KM8554およびKM8555のL鎖可変領域DNAを有する大腸菌 (FERM BP-6718) などがあげられる。

### 3. 遺伝子組換え抗体の作製方法 (2)

#### (1) 抗体断片Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>の作製方法

上述した抗体を酵素で処理することにより、抗体断片を生成させる。酵素としては、パパイン、トリプシンなどをあげることができる。

または、該抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体のFab、Fab'あるいはF(ab')<sub>2</sub>をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入する

ことにより発現させ、Fab、Fab'あるいはF(ab')<sub>2</sub>を製造することができる。

生成される抗体断片は、ゲル濾過、イオン交換、アフィニティークロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) [Nature, 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 (アンチボディズ, Chapter 12, 1988) 等で測定する。

精製したFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>の反応性、また、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>のVEGFに対する阻害活性の測定は前記1 (4) に記載の方法などにより測定することができる。

## (2) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1一本鎖抗体の作製方法

前記2 (2)、2 (5) および2 (6) に記載のヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型CDR 移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを一本鎖抗体発現用ベクターに挿入することによりヒト以外の動物の抗体の一本鎖抗体あるいはヒト型CDR移植抗体の一本鎖抗体の発現ベクターを構築することができる。ここで用いる一本鎖抗体発現用ベクターとしてはヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型CDR 移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを組み込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。

例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223(1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 1527 (1981)]、pSG1βd2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。一本鎖抗体を発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。また、適切なシグナルペプチドをコードするcDNAを発現用ベクターに挿入することで一本鎖抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラスマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

選択された発現用ベクターに、VH-P-VLあるいはVL-P-VH (Pはペプチドリンカー) からなる一本鎖抗体をコードするcDNAを適切なプロモーター、シグナルペプチドの下流に挿入することにより、目的の一本鎖抗体をコードするcDNAが挿入された一本鎖抗体発現ベクターを構築することができる。

一本鎖抗体をコードするcDNAは、VHをコードするcDNAとVLをコードするcDNAとを、両端に適当な制限酵素の認識配列を有するペプチドリンカーをコードす

る合成DNAを用いて連結することにより得ることができる。リンカーペプチドは、その付加がVH、VLの抗原への結合に対して妨害しないように最適化することが重要で、例えばPantolianoらにより示されたもの [Biochemistry, 30, 10117 (1991)] あるいはそれを改変したものを用いることができる。

### (3) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1ジスルフィド安定化抗体の作製方法

ジスルフィド安定化抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAあるいはヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAのそれぞれの適切な位置の1アミノ酸残基に相当するDNA配列をシステイン残基に相当するDNA配列に改変し、発現および精製したのち、ジスルフィド結合を形成させることで作製することができる。アミノ酸残基のシステイン残基への改変は前記2(5)のPCRを用いた変異導入法により行うことができる。

得られた改変VHおよび改変VLをコードするcDNAを適切な発現用ベクターに挿入することによりジスルフィド安定化抗体H鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体L鎖発現ベクターを構築することができる。ここで用いるジスルフィド安定化抗体発現用ベクターとしては改変VHおよび改変VLをコードするcDNAを組み込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307(1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 1527 (1981)]、pSG1 $\beta$ d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。ジスルフィド安定化抗体を形成させるためにジスルフィド安定化抗体L鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体H鎖発現ベクターを発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。

また、適切なシグナルペプチドをコードするcDNAを発現用ベクターに挿入することでジスルフィド安定化抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

### (4) 各種抗体の発現および活性評価

前記(1)～(3)で構築された抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体発現ベクター、ジスルフィド安定化抗体H鎖発現ベクターあるいはジスルフィド安定化抗体L鎖発現ベクターをエレクトロポレーション法 [特開平2-257891, Cytotechnology, 3, 133 (1990)] 等の方法により宿主細胞へ導入することにより、

目的の抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖を生産する形質転換株を取得することができる。発現ベクターの導入後、培養上清等に含まれる抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖の発現は前記1（4）に記載の方法等により確認することができる。

一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖の回収および精製は公知の技術を組み合わせることにより達成することができる。例えば、抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖が培地中に分泌されるならば、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。また、宿主細胞のペリプラズマ領域へと輸送されるならば、その細胞に浸透圧ショックを与え、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。不溶性であり、かつ顆粒（インクルージョン・ボディー）として存在している抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖は、細胞の溶解、顆粒を単離するための遠心分離と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-塩酸による可溶化後、各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。

精製された一本鎖抗体は、前記1（4）に記載の方法等により測定することができる。

精製されたジスルフィド安定化抗体H鎖とジスルフィド安定化抗体L鎖は、各々を混合したのち、活性を有する構造へと導く操作 [refolding 操作; Molecular Immunology, 32, 249 (1995)] によりジスルフィド結合を形成させた後、抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲルろ過により活性を有するジスルフィド安定化抗体を精製することができる。ジスルフィド安定化抗体の活性は前記1（4）に記載の方法等により測定することができる。

#### 4. 結合抗体の作製方法

抗体と毒素蛋白とを化学的に結合させた結合抗体は、例えば文献 [Anticancer Research, 11, 2003 (1991); Nature Medicine, 3, 350 (1996)] 記載の方法に従って作製することができる。抗体と毒素、サイトカイン等の蛋白質と

を遺伝子工学的に結合させた結合抗体は、例えば文献 [Proceeding of National Academy of Science USA, 93, 974 (1996); Proceeding of National Academy of Science USA, 93, 7826 (1996)] 記載の方法に従って作製することができる。抗体と低分子抗癌剤を化学的に結合させた結合抗体は、例えば文献 [Science, 261, 212 (1993)] 記載の方法に従って作製することができる。抗体と放射性同位元素を化学的に結合させた結合抗体は、例えば文献 [Antibody Immunconjugates and Radiopharmaceuticals, 3, 60 (1990); Anticancer Research, 11, 2003 (1991)] 記載の方法に従って作製することができる。

これらの誘導体は、抗体分子の特異性に従って放射性同位元素、蛋白質（サイトカイン、トキシン、酵素など）、低分子の薬剤などを標的組織周辺に集積させることで、より効果的で副作用の少ない診断あるいは治療を可能にすることが期待されている。

#### 5. 単球・マクロファージが関与する疾患の診断方法

単球、マクロファージが関与する疾患としては、炎症性疾患、遅延型過敏症、動脈硬化、悪性腫瘍などがあげられる。本発明で使用される抗体を用いた診断方法としては、例えば、被験者の細胞あるいは組織に存在するヒトVEGF受容体Flt-1を下記に述べるように、免疫学的に検出または定量する方法があげられる。

VEGF受容体Flt-1に対する抗体を用いて単球、マクロファージを免疫学的に検出または定量する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法 (ELISA)、放射性物質標識免疫抗体法 (RIA)、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法 (ABC法、CSA法等)、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチELISA 法 [単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック、1987年)、続生化学実験講座 5 免疫生化学研究法 (東京化学同人、1986年)] などがあげられる。

蛍光抗体法は、文献 [Monoclonal Antibodies: Principles and practice, Third edition (Academic Press, 1996), 単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック、1987)] 等に記載された方法を用いて行うことができる。具体的には、分離した細胞あるいは組織などに、本発明で使用される抗体を反応させ、さらにフルオレシシン・イソチオシアネート (FITC) あるいはフィコエリスリンなどの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。



免疫細胞染色法、免疫組織染色法などの免疫組織化学染色法（ABC法、CSA法等）は、文献 [Monoclonal Antibodies: Principles and practice, Third edition (Academic Press, 1996), 単クローン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック, 1987）] 等に記載された方法を用いて行うことができる。

免疫酵素抗体法（ELISA）は、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明で使用する抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法（RIA）は、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明で使用する抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法は、分離した、細胞あるいは組織などに、本発明で使用する抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート（FITC）などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

ウェスタンブロッティング法は、生体内から分離された細胞またはその破砕液、組織またはその破砕液、細胞培養上清、血清などをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] で分画した後、該ゲルをPVDF膜あるいはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウスIgG抗体あるいは結合断片を反応させた後、確認する。

免疫沈降法とは、生体内から分離された細胞またはその破砕液、組織またはその破砕液、細胞培養上清、血清などを本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片と反応させた後、プロテインG—セファロース等のイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させるものである。

サンドイッチELISA法とは、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片で、抗原認識部位の異なる2種類のモノクローナル抗体のうち、あらかじめ一方のモノクロー

ナル抗体または抗体断片はプレートに吸着させ、もう一方のモノクローナル抗体または抗体断片はFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素で標識しておく。抗体吸着プレートに、生体内から分離された細胞またはその破砕液、組織またはその破砕液、細胞培養上清、血清などを反応後、標識したモノクローナル抗体またはその抗体断片を反応させ、標識物質に応じた反応を行う方法である。

#### 6. 単球・マクロファージに関与する疾患の治療薬および診断薬

上述した抗Flt-1抗体、該抗体断片またはそれらの誘導体は、単球・マクロファージ上のFlt-1と結合し、VEGFにより誘導される単球の遊走を阻害し、また、ADCC、CDC等の抗体のエフェクター活性を介してVEGF受容体Flt-1を細胞表面に発現している細胞を破壊するため、単球・マクロファージの遊走阻害剤として用いることができ、単球・マクロファージが関与する疾患の治療等に有用である。

本発明に使用される抗体を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体またはペプチド製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピ

ルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体またはペプチドそのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

本発明で使用される抗体は、単球・マクロファージが関与する疾患の診断薬あるいは治療薬に用いることができる。

さらに、本発明で使用される抗体のうち、ヒトFlt-1に対して中和活性を有する抗体は、ヒトVEGFのFlt-1への結合を阻害する。すなわち、Flt-1自己リン酸化を阻害し、VEGF依存的にヒト単球の遊走を阻害する。したがって、炎症性疾患、遅延型過敏症、動脈硬化または悪性腫瘍など単球・マクロファージの浸潤を伴う疾患の治療薬として用いることができる。炎症性疾患としては、慢性関節リュウマチ、若年性慢性関節炎、全身性硬化症、自己免疫性甲状腺疾患、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎などがあげられる。遅延型過敏症としては、接触性皮膚炎などがあげられる。動脈硬化としては、粥状硬化などがあげられる。悪性腫瘍としては、メラノーマ、乳癌、脳腫瘍などがあげられる。

また、本発明で使用される抗体を用いて、単球・マクロファージの遊走阻害活性を測定する方法は、文献[Blood, 87, 3336 (1996)]記載の方法等に従って行うことができる。

以下に、本発明の実施例を示す。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、ヒト末梢血単核球をフローサイトメーターにより前方散乱値および

側方散乱値を測定した結果を示す。Mのゲートは単球を、Lのゲートはリンパ球を示す。

第2図は、第1図のMのゲートの単球について、フローサイトメーターにより抗CD97抗体および抗CD11b抗体との反応性を検討した結果を示す。

第3図は、第1図のMのゲートの単球について、フローサイトメーターにより抗CD97抗体および抗CD11c抗体との反応性を検討した結果を示す。

第4図は、第1図のLのゲートのヒトリンパ球と抗Flt-1抗体および抗CD34抗体との反応性を検討した結果を示す。

第5図は、第1図のMのゲートのヒト単球と抗Flt-1抗体および抗CD34抗体との反応性を検討した結果を示す。

第6図は、第1図のMのゲートのヒト単球と抗Flt-1抗体および抗CD97抗体との反応性を検討した結果を示す。

第7図は、ヒト臍帯静脈血単核球をフローサイトメーターにより前方散乱値および側方散乱値を測定した結果を示す。Mのゲートは単球を、Lのゲートはリンパ球を示す。

第8図は、第7図のLのゲートのヒトリンパ球と抗CD97抗体および抗CD34抗体との反応性を検討した結果を示す。

第9図は、第7図のLのゲートのヒトリンパ球と抗Flt-1抗体および抗CD97抗体との反応性を検討した結果を示す。

第10図は、ヒト臍帯静脈血のCD34陽性細胞を培養して得た単球をフローサイトメーターにより前方散乱値および側方散乱値を測定した結果を示す。Mのゲートは単球を、Lのゲートはリンパ球を示す。。

第11図は、第10図のMのゲートのヒト単球と抗CD97抗体および抗CD34抗体との反応性を検討した結果を示す。

第12図は、第10図のMのゲートのヒト単球と抗Flt-1抗体および抗CD34抗体との反応性を検討した結果を示す。

第13図は、ヒト単球の遊走能に対するVEGFおよび抗Flt-1抗体の効果を検討した結果を示す。

第14図は、プラスミドpBS1732Hの造成工程を示した図である。

第15図は、プラスミドpBS1732Lの造成工程を示した図である。

第16図は、プラスミドpKANTEX1732Hの造成工程を示した図である。

第17図は、プラスミドpKANTEX1732の造成工程を示した図である。

第18図は、プラスミドpBS1750Hの造成工程を示した図である。

第19図は、プラスミドpBS1750Lの造成工程を示した図である。

第20図は、プラスミドpKANTEX1750Hの造成工程を示した図である。

第21図は、プラスミドpKANTEX1750の造成工程を示した図である。

第22図は、精製した抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532およびKM2550のSDS-PAGE (4~15%グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した図である。レーン1が低分子マーカ、レーン2が還元条件下でのKM2532、レーン3が還元条件下でのKM2550、レーン4が高分子マーカ、レーン5が非還元条件下でのKM2532、レーン6が非還元条件下でのKM2550の泳動パターンをそれぞれ示す。

第23図は、精製した抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532およびKM2550の可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nとの結合活性を示した図である。(A)はプレートに吸着させる可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nの濃度を一定 ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) にし、添加するヒト型キメラ抗体濃度を変化させた場合の結果である。縦軸は可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nとの結合活性、横軸はヒト型キメラ抗体濃度をそれぞれ示す。 $\Delta$ がKM2532、 $\bigcirc$ がKM2550の活性をそれぞれ示す。(B)はプレートに吸着させる可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nの濃度を変化させ、一定濃度 ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ) のヒト型キメラ抗体の結合活性を測定した結果である。縦軸は可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nとの結合活性、横軸はプレートに吸着させた可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nの濃度をそれぞれ示す。 $\Delta$ がKM2532、 $\bigcirc$ がKM2550の活性をそれぞれ示す。

第24図は、精製した抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体KM2532およびKM2550によるヒトVEGFとヒトVEGF受容体Flt-1の結合阻害活性を示した図である。 $\bigcirc$ がKM1732、 $\square$ がKM1750、 $\bullet$ がKM2532、 $\blacksquare$ がKM2550の活性をそれぞれ示す。

第25図は、プラスミドpKM1732HV0の造成工程を示した図である。

第26図は、プラスミドpKM1750HV0の造成工程を示した図である。

第27図は、プラスミドpKM1732LV0の造成工程を示した図である。

第28図は、プラスミドpKM1750LV0(IV)の造成工程を示した図である。

第29図は、プラスミドpKANTEX1732HV0の造成工程を示した図である。

第30図は、プラスミドpKANTEX1732HV0LV0の造成工程を示した図である。

第31図は、プラスミドpKANTEX1750HV0LV0(IV)を示した図である。

第32図は、抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体KM1732、KM1750、およ

び抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550の、可溶性ヒトVEGF受容体およびその誘導体であるFlt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2およびKDR 7Nの結合反応性を酵素免疫測定法で検討した結果を示す。

第33図は、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550の可溶性ヒトVEGF受容体およびその誘導体であるFlt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2およびKDR 7Nの濃度依存性結合反応について酵素免疫測定法で検討した結果を示す。

第34図は、可溶性ヒトVEGF受容体の各種誘導体の模式図を示す。

第35図は、プラスミドphKM1750LV0 (I)の造成工程を示した図である。

第36図は、プラスミドpKANTEX1750HV0LV0 (I)の造成工程を示した図である。

第37図は、プラスミドphKM1750HV3の造成工程を示した図である。

第38図は、プラスミドphKM1750LV4の造成工程を示した図である。

第39図は、プラスミドpKANTEX1750HV3LV0 (I)の造成工程を示した図である。

第40図は、プラスミドpKANTEX1750HV3LV0 (IV)の造成工程を示した図である。

第41図は、プラスミドpKANTEX1750HV0LV4の造成工程を示した図である。

第42図は、プラスミドpKANTEX1750HV3LV4の造成工程を示した図である。

第43図は、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2550およびヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555のSDS-PAGE (4~15%グラジエントゲルを使用)の電気泳動パターンを示した図である。レーン1~9は非還元条件下での電気泳動パターン、レーン10~19までは還元条件下での電気泳動パターンを示す。レーン1および10は高分子分子量マーカー、レーン19は低分子分子量マーカー、レーン2および11はコントロール抗体であるKM8969、レーン3および12はKM2550、レーン4および13はKM8550、レーン5および14はKM8551、レーン6および15はKM8552、レーン7および16はKM8553、レーン8および17はKM8554、レーン9および18はKM8555を示す。

第44図は、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2550およびヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555の可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nとの結合活性を示した図である。

第45図は、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2550およびヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555の可溶性ヒトVEGF受容体各種誘導体Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2、KDR 7Nとの結合活性を示した図である。

第46図は、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2550およびヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555によるヒトVEGFとヒトVEGF受容体Flt-1の結合阻害活性を示した図である。

第47図は、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体およびCDR移植抗体のH鎖可変領域のアミノ酸配列を示した図である。図中、KM1750mouseとは、KM1750のH鎖可変領域アミノ酸配列、KM1750HV0とは、KM1750のH鎖可変領域内のCDRをヒトフレームワークに挿入して構成されるアミノ酸配列、KM1750HV3とは、KM1750HV0のフレームワークのアミノ酸配列を一部KM1750mouseのアミノ酸に置換したアミノ酸配列を、それぞれ示す。

第48図は、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体およびCDR移植抗体のL鎖可変領域のアミノ酸配列を示した図である。図中、KM1750mouseとは、KM1750のL鎖可変領域アミノ酸配列、KM1750LV0(I)とは、KM1750のL鎖可変領域内のCDRをヒトフレームワークに挿入して構成されるアミノ酸配列、KM1750LV4とは、KM1750LV0(I)のフレームワークのアミノ酸配列を一部KM1750mouseのアミノ酸に置換したアミノ酸配列を、それぞれ示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

実施例 1 抗ヒトFlt-1モノクローナル抗体のヒト末梢血単球に対する反応性

ヒト単球に対する抗ヒトFlt-1モノクローナル抗体KM1730 (W098/22616) の反応性を蛍光抗体染色法を用いて以下の手順に従い確認した。

最初に以下の手順により、ヒト末梢血より単球およびリンパ球を含む単核球画分を分離し、抗CD11b抗体、抗CD11c抗体および抗CD97抗体 [Leukocyte Typing VI: Kishimoto et al., Garland Publishing (1997)] との反応性を確認した。

CD11b、CD11cおよびCD97は、単球上に発現している [Leukocyte Typing VI: Kishimoto et al., Garland Publishing (1997)]。

文献 [The Journal of Immunology, 147, 2251 (1991)] 記載のFicoll/Paque密度勾配遠心法に従い、ヒト健常人の末梢血より、単球およびリンパ球を含む単核球画分を回収した。該単核球画分をPBS (137 mM NaClおよび2.7 mM KClを含む9.6 mMリン酸緩衝液 pH7.4) で洗浄後、0.1%ウシアルブミン (以下、BSAと記する: シグマ社製) を含むPBS (以下、0.1%BSA-PBSと記する) に浮遊化させた。単核球 $3 \times 10^6$ 個を $12 \times 75$ mmガラスチューブ (岩城硝子社製) に0.1%BSA-PBS 300  $\mu$ lに懸濁して分注し、FITC (Fluorescein Isothiocyanate) 標識抗CD

97抗体（ファーマンジェン社製）、PE（Phycoerythrin）標識抗CD11c抗体（ベックマン・コールター社製）、ビオチン標識抗CD11b抗体（ベックマン・コールター社製）の原液を各10 $\mu$ lずつガラスチューブに加え、室温で15分間単核球と抗体とを反応させた。反応後、遠心分離したのちに洗浄し、300 $\mu$ lの0.1%BSA-PBSに浮遊し、50倍希釈したストレプトアビジン-APC（ベクトンディッキンソン社製）10 $\mu$ l加え、室温で15分間反応させた。反応後、遠心分離したのちに洗浄し、フローサイトメーター（Epics Elite：コールター社製）を用いて解析した。その結果を第1図、第2図および第3図にそれぞれ示した。

第1図は単核球画分について、縦軸を前方散乱光値、横軸を側方散乱光値としてプロットしたサイトグラムを示す。単核球画分には、Mで示した単球およびLで示したリンパ球が含まれる。Mで示した単球画分にサイトグラム中の指定した領域の細胞を選択し（以下、サイトグラム中の指定した領域の細胞を選択することを、ゲートをかけると記す）、単球と抗CD11b抗体、抗CD11c抗体、抗CD97抗体との反応性を検討した。結果を第2図および第3図に示した。単球での発現が報告されているCD11b、CD11cおよびCD97 [Leukocyte Typing VI: Kishimoto et al., Garland Publishing (1997)] が全て反応したことから、本実施例で用いたゲートMの細胞は単球であることが確認された。

次に、単球およびリンパ球について抗Flt-1抗体の反応性を以下に示す手順に従い検討した。

CD34は、血液幹細胞が発現しているマーカーとして知られている [Leukocyte Typing VI: Kishimoto et al., Garland Publishing (1997)]。

抗Flt-1モノクローナル抗体、抗CD34抗体との反応性については、単核球3 $\times$ 10<sup>6</sup>個を12 $\times$ 75mmガラスチューブ（岩城硝子社製）に0.1%BSA-PBS 300 $\mu$ lに懸濁して分注し、抗ヒトFlt-1モノクローナル抗体KM1730 1mg/mlを10 $\mu$ l加え、室温で15分間反応させた。反応後、遠心分離したのち洗浄し、300 $\mu$ lの0.1%BSA-PBSに浮遊し、50倍希釈したPE標識ヤギ抗マウスIgG（ダコ社製）10 $\mu$ l加え、室温で15分間反応させた。反応後、遠心分離したのち洗浄し、300 $\mu$ lの0.1%BSA-PBSに浮遊し、PC5（PE-Cy5の略；PE：Phycoerythrin, Cy5：商標）標識した抗CD34抗体（クラスIII：ベックマンコールター社製）10 $\mu$ l加え、室温で15分間反応させた。反応後、遠心分離したのち洗浄し、フローサイトメーター（Epics Elite：コールター社製）を用いて解析を行った。

第4図および第5図に、ゲートLのリンパ球およびゲートMの単球に対するK



M1730および抗CD34抗体の反応性をそれぞれ示した。図中、領域1はCD34陽性Flt-1陰性細胞、領域2はCD34陽性Flt-1陽性細胞、領域3はCD34陰性Flt-1陰性細胞、領域4はCD34陰性Flt-1陽性細胞をそれぞれ示す。リンパ球については領域3の抗Flt-1抗体および抗CD34抗体が共に反応しない細胞が87.9%と大多数を占めたのに対し、単球については領域4の抗CD34抗体には反応しないが抗Flt-1抗体が反応する細胞が84.9%と大多数を占めた。従って、単核球の中でFlt-1抗体は単球に選択的に反応することが明らかとなった。

単球と抗Flt-1モノクローナル抗体および抗CD97抗体との反応性を以下のようにして検討した。単核球 $3 \times 10^6$ 個を $12 \times 75$ mmガラスチューブ（岩城硝子製）に0.1%BSA-PBS  $300 \mu\text{l}$ に懸濁して分注し、 $1\text{mg/ml}$ 抗ヒトFlt-1モノクローナル抗体KM1730を $10 \mu\text{l}$ 加え、室温で15分間反応させた。反応後、遠心分離したのち洗浄し、 $300 \mu\text{l}$ の0.1%BSA-PBSに浮遊し、50倍希釈したPE標識ヤギ抗マウスIgG（ダコ社製） $10 \mu\text{l}$ 加え、室温で15分間反応させた。反応後、遠心分離したのち洗浄し、 $300 \mu\text{l}$ の0.1%BSA-PBSに浮遊し、FITC標識した抗CD97抗体（ファーマンジェン社製）の原液を $10 \mu\text{l}$ 加え、室温で15分間反応させた。反応後、遠心分離したのち洗浄し、フローサイトメーター（Epics Elite: コールター社製）を用いて解析を行った。結果を第6図に示した。

第6図にゲートMの単球に対する抗Flt-1モノクローナル抗体KM1730（W098/22616）、抗CD97抗体の反応性を示した。領域2は抗Flt-1抗体および抗CD97抗体が共に反応する細胞を示しているが、83.1%と大多数の割合を占めた。従って、CD97を発現している単球細胞上に抗Flt-1抗体が反応することが確認された。

実施例2 抗ヒトFlt-1モノクローナル抗体のヒト臍帯静脈細胞および分化した単球に対する反応性

実施例1により抗Flt-1抗体は健常人の末梢血より調製した単球に反応することが確認されたので、単球の分化段階における抗Flt-1抗体の反応性を検討する目的で、ヒト臍帯静脈細胞中の血液幹細胞より単球を分化させ、分化前後の細胞に対する抗ヒトFlt-1モノクローナル抗体KM1730（W098/22616）の反応性を蛍光抗体染色法を用いて、以下の手順に従い確認した。

最初に以下の手順により、ヒト臍帯血より、単球およびリンパ球を含む単核球画分を分離し、血液幹細胞との反応性が報告されている抗CD34抗体 [Leukocyte Typing VI: Kishimoto et al., Garland Publishing (1997)]、単球との

反応性が報告されている抗CD97抗体 [Leukocyte Typing VI: Kishimoto et al., Garland Publishing (1997)]、抗Flt-1抗体との反応性を以下に示す手順に従い確認した。

文献 [Blood, 90, 4363 (1997)] 記載のFicoll/Paque密度勾配遠心法に従い、ヒト臍帯血より単球およびリンパ球を含む単核球画分を回収した。単核球画分をPBSで洗浄後、0.1%BSA-PBSに浮遊化させた。単核球 $3 \times 10^6$ 個を $12 \times 75$ mmガラスチューブ（岩城硝子社製）に0.1%BSA-PBS 300 $\mu$ lに懸濁して分注し、1mg/ml抗Flt-1モノクローナル抗体KM1730を10 $\mu$ l加え、室温で15分間反応させた。

反応後、遠心分離したのち洗浄し、300 $\mu$ lの0.1%BSA-PBSに浮遊し、50倍に希釈したPE標識ヤギ抗マウスIgG（ダコ社製）10 $\mu$ l加え、室温で15分間反応させた。反応後、遠心分離したのち洗浄し、300 $\mu$ lの0.1%BSA-PBSに浮遊し、PC5標識抗CD34抗体（クラスIII：ベックマン・コールター社製）およびFITC標識した抗CD97抗体（ファーマンジェン社製）の原液を各10 $\mu$ l加え、室温で15分間反応させた。反応後、遠心操作により洗浄し、フローサイトメーター（Epics Elite：コールター社製）を用いて解析を行った。その結果を第7図、第8図および第9図に示した。

第7図は単核球画分について、縦軸を前方散乱光値、横軸を側方散乱光値としてプロットしたサイトグラムを示す。単核球画分には、Mで示した単球およびLで示したリンパ球が含まれる。血液幹細胞はLで示したリンパ球画分に含まれる。Lで示したリンパ球画分にゲートをかけ、抗CD34抗体および抗CD97抗体の反応性を検討した結果を第8図に示した。Lの画分は血液幹細胞マーカーであるCD34陰性であり、かつ、単球マーカーであるCD97陰性である細胞が99.4%（領域3）とほとんどであった。血液幹細胞の含まれるCD34陽性細胞は、0.2%（領域1）と非常に低い割合で含まれるが、該細胞群には抗CD97抗体はほとんど反応しなかった。

Lで示したリンパ球画分にゲートをかけ、抗CD34抗体、抗Flt-1抗体の反応性を検討した結果を第9図に示した。Lの画分は血液幹細胞マーカーであるCD34陰性であり、かつ、Flt-1陰性である細胞が98.6%（領域3）がほとんどであった。血液幹細胞の含まれるCD34陽性細胞は0.2%（領域1）と非常に低い割合で含まれるが、この細胞群には抗Flt-1抗体はほとんど反応しなかった。

以上の結果から、ヒト臍帯血より調製した血液幹細胞を含むCD34陽性細胞には、単球との反応性が報告されている抗CD97抗体、ならびに、実施例1におい

て単球との反応性が確認された抗Flt-1抗体は反応性を示さないことが明らかとなった。

次に、ヒト臍帯血より血液幹細胞を含むCD34陽性細胞を調製し、調製した細胞に各種サイトカインを添加し、単球系細胞へ分化させ、該単球系細胞と抗CD34抗体、抗CD97抗体、抗Flt-1抗体との反応性を以下に示す手順に従い確認した。

第8図で示した抗CD34抗体に反応し、抗CD97抗体に反応しない細胞集団（領域1）を文献[Blood, 93, 2525 (1999)]記載の方法に従いソーティング法により回収した。回収したCD34陽性細胞を30%FCS (Hyclone社製)を含む $\alpha$ -MEM培地(ICNBiochemicals社製)に懸濁し、 $1 \times 10^4$ 細胞/2ml/6ウェルプレートになるように加え、さらにIL-3[終濃度200U/ml: Proceeding of National Academy of Science USA, 92, 2859 (1995)]、IL-6[終濃度200U/ml: Blood, 91, 187 (1998)]、M-CSF[終濃度100ng/ml: Blood, 92, 118 (1998)]、GM-CSF[終濃度20ng/ml: Proceeding of National Academy of Science USA, 92, 2859 (1995)]、Flt-3リガンド(終濃度100ng/ml: R&D社製)を添加し、37°C、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で7日間培養した。

培養後細胞を回収し、PBSで洗浄後、0.1%BSA-PBSに浮遊化させた。回収した細胞 $3 \times 10^6$ 個を12×75mmガラスチューブ(岩城硝子社製)に0.1%BSA-PBS 300 $\mu$ lに懸濁して分注し、1mg/ml抗Flt-1モノクローナル抗体KM1730を10 $\mu$ l加え、室温で15分間反応させた。反応後、遠心分離したのち洗浄し、300 $\mu$ lの0.1%BSA-PBSに浮遊し、50倍に希釈したPE標識ヤギ抗マウスIgG(ダコ社製)10 $\mu$ l加え、室温で15分間反応させた。反応後、遠心分離したのち洗浄し、300 $\mu$ lの0.1%BSA-PBSに浮遊し、PC5標識した抗CD34抗体(クラスIII: ベックマン・コールター製)およびFITC標識した抗CD97抗体(ファーマンジェン社製)の原液を各10 $\mu$ l加え、室温で15分間反応させた。反応後、遠心分離したのち洗浄し、フローサイトメーター(Epics Elite: コールター社製)を用いて解析を行った。その結果を第10図、第11図および第12図に示した。

第10図はCD34陽性細胞を上述のサイトカインを加え培養した細胞について、縦軸を前方散乱光値、横軸を側方散乱光値としてプロットしたサイトグラムを示す。Mで示した単球が大多数であり、CD34陽性細胞から単球への分化が確認された。

第10図のMにゲートをかけ、抗CD34抗体および抗CD97抗体の反応性を検討した結果を第11図に示した。Mの画分は血液幹細胞マーカーであるCD34陰性

であり、かつ、単球マーカーであるCD97陽性である細胞が84.6%（領域4）がほとんどであり、CD34陽性の血液幹細胞よりCD97陽性の単球への分化が確認された。

Mで示した単球画分にゲートをかけ、抗CD34抗体、抗Flt-1抗体の反応性を検討した結果を第12図に示した。抗Flt-1抗体が強く反応する細胞集団と抗Flt-1抗体が弱く反応する細胞集団に分離された。いずれの集団も抗CD34抗体の反応性はほとんど認められなかった。従って、CD97陽性である単球に分化した細胞には抗Flt-1抗体が強く反応する細胞群と抗Flt-1抗体が弱く反応する細胞群に分かれることが明らかとなった。

以上の結果から、抗Flt-1抗体はヒト臍帯血のCD34陽性の血液幹細胞には反応しないこと、単球に分化すると抗Flt-1抗体が反応すること、分化した単球は抗Flt-1抗体が強く反応する細胞群と弱く反応する細胞群に分かれることが明らかとなった。

実施例3 VEGF依存的なヒト単球の遊走に対する抗ヒトFlt-1モノクローナル抗体による阻害

#### 単球の分離方法

実施例1に記載の方法に従いヒト健常人の末梢血より単核球層を回収した。単核球画分を10%牛胎児血清（FCS：JRH Biosciences社製）、40 $\mu$ g/mlカナマイシン（明治製菓社製）を含むRPMI1640培地（日水製薬社製）（以下10%FCS-RPMI1640培地と記する）に $2 \times 10^7$ 細胞/10mlになるように浮遊させた。あらかじめ10%FCS-RPMI1640培地を50ml加え4 $^{\circ}$ Cで一晩放置したシャーレ（低面積225cm<sup>2</sup>）に上記の単核球浮遊液を加え、37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>インキュベーターにて2時間培養し、単球をシャーレに付着させた。培養後、培地と共に浮遊細胞を除き、37 $^{\circ}$ Cに暖めたPBSを50 ml加え、浮遊細胞を更に除く操作を2回繰り返した。プレートに0.2%EDTA-Na、5%FCSを含むPBSを5 ml加え室温で20分間インキュベートし、ピペットを用いて付着した単球を回収した。単球を回収後、10%FCS-RPMI1640培地にて3回洗浄し、0.5%FCS-RPMI1640培地を加え $1 \times 10^6$ 個/mlに浮遊させた。

#### 遊走実験法

Neuro Probe 48-well microchemotaxis Chamber (NeuroProbe社製) の下層に0.5%FCS-RPMI培地を25 $\mu$ l添加した。さらに昆虫細胞で発現したヒト組換えVEGF [Japanese Journal of Cancer Research, 88, 867 (1997)] を終濃度0、4、12ng/mlになるように添加し、一部の下層には抗ヒトFlt-1モノクローナル抗体K

M1732を終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$  になるように添加した。単球遊走促進活性物質の陽性コントロールとしてはfMLP (N-Formyl-Met-Leu-Phe : シグマ社製)  $5\text{nM}$ を用い下層に添加した。下層の上にフィルター ( $5\mu\text{m}$ -pore size PVP(-) polycarbonate filter : Neuro Probe社製) を重層し、さらにフィルターの上層に、0.5%FCS-R PMI1640培地中で $1 \times 10^6$ 個/ $\text{ml}$ に浮遊させたヒト単球を $50 \mu\text{l}$ 添加した。 $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$ インキュベーターで2時間培養後、フィルターを回収し、上層より下層に遊走した細胞をDiff-Quik (国際試薬社製) で染色した。倍率400倍で顕微鏡にて10視野の細胞数を測定し、10視野の細胞数の平均値および標準偏差値を求めた。その結果を第13図に示した。

第13図のようにVEGF非添加に比べ、陽性コントロールfMLP  $5\text{nM}$ はヒト単球の遊走数を2.5倍に促進した。VEGF $4\text{ng/ml}$ ではヒト単球の遊走は促進されなかったが、VEGF $12\text{ng/ml}$ では遊走する単球の数が1.78倍に増加した。VEGF $12\text{ng/ml}$ 添加時に抗ヒトFlt-1モノクローナル抗体KM1732を添加すると単球の遊走数はVEGF非添加時の数まで阻害された (91.4%阻害)。

以上のことから、VEGFにより促進されるヒト単球の遊走は、抗ヒトFlt-1モノクローナル抗体により完全に阻害されることが明らかとなった。

#### 参考例 1

#### 1. 抗ヒトVEGF受容体Flt-1 マウスモノクローナル抗体をコードするcDNAの単離および解析

(1) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1 マウスモノクローナル抗体生産ハイブリドーマからのmRNAの取得

インビトロジェン社製のmRNA抽出キットであるFast Trackを用い、キットに添付の使用説明書に従って、抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732およびKM1750生産ハイブリドーマ (それぞれFERM BP-5698、FERM BP-5700)の各 $1 \times 10^8$ 細胞より、それぞれmRNAを取得した。

(2) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1 マウスモノクローナル抗体生産ハイブリドーマの重鎖および軽鎖cDNAライブラリーの作製

参考例1の1(1)で取得したKM1732およびKM1750のmRNAの各 $5 \mu\text{g}$  から、cDNA Synthesis Kit (ファルマシア バイオテック社製) を用い、キットに添付の使用説明書に従って、両端にEcoR I -NotI アダプターを有するcDNAをそれぞれ合成した。作製したそれぞれのcDNAの約 $6 \mu\text{g}$  を $10 \mu\text{l}$ の滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgG型抗体の重鎖 (以下、H鎖と表記する) に

対応する約1.5kbのcDNA断片と軽鎖（以下、L鎖と表記する）に対応する約1.0kbのcDNA断片をそれぞれ約0.1 $\mu$ g回収した。次に、それぞれの約1.5kbのcDNA断片0.1 $\mu$ gおよび約1.0kbのcDNA断片0.1 $\mu$ gと、Lambda ZAPII Vector (Lambda ZAPII Vector をEcoRIで切断後、Calf Intestine Alkaline Phosphataseで処理したもの：ストラタジーン社製)の1 $\mu$ gをT4 ligase緩衝液（宝酒造社製）11.5 $\mu$ lに溶解し、T4 DNA ligase（宝酒造社製）175単位を加えて、12°Cにて24時間インキュベートし、さらに室温にて2時間インキュベートした。それぞれの反応液のうち4 $\mu$ lを常法（モレキュラー・クローニング 第2版）に従い、Gigapack Gold Packaging Kit（ストラタジーン社製）を使用してラムダファージにパッケージングし、これらを常法（モレキュラー・クローニング 第2版）に従って、Gigapack Gold Packaging Kit（ストラタジーン社製）に付属の大腸菌株XL1-Blue [Biotechniques, 5, 376 (1987)]に感染させて、KM1732およびKM1750のH鎖cDNAライブラリーおよびL鎖cDNAライブラリーとしてそれぞれ約4 $\times 10^3$ 個のファージクローンを取得した。

（3）抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体生産ハイブリドーマのH鎖およびL鎖をコードするcDNAのクローニング

参考例1の1（2）で作製したそれぞれのファージを常法（モレキュラー・クローニング 第2版）に従い、ニトロセルロースフィルター上に固定した。各ニトロセルロースフィルターを用いてECL direct nucleic acid labeling and detection systems（アマシャム社製）に添付の使用説明書に従い、マウス免疫グロブリンの定常領域（以下、C領域と表記する）をコードするcDNA [H鎖はマウスC $\gamma$ 1cDNAの断片 [Cell, 18, 559 (1979)]、L鎖はマウスC $\kappa$ cDNAの断片 [Cell, 22, 197 (1980)] をプローブとしてそれと強く結合したファージクローンを取得した。次に、Lambda ZAPII Vector（ストラタジーン社製）に添付の使用説明書に従い、ファージクローンをプラスミドpBluescriptSK(-)に変換し、最終的にKM1732のH鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドKM1732HA2およびKM1732のL鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドKM1732L2-1、KM1750のH鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドKM1750H2-1およびKM1750のL鎖をコードするcDNAを含む組換えプラスミドKM1750L3-1を取得した。組換えプラスミドKM1732HA2を有する大腸菌XL1-Blue MRF'/KM1732HA2、組換えプラスミドKM1732L2-1を有する大腸菌XL1-Blue MRF'/KM1732L2-1、組換えプラスミド1750H2-1を有する大腸菌XL1-Blue MRF'/KM1750H2-1および組換えプラスミド

KM1750L3-1を有する大腸菌XL1-Blue MRF'/KM1750L3-1を有する大腸菌株は、それぞれFERM BP-6354、FERM BP-6352、FERM BP-6353、FERM BP-6355として、平成10年5月14日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託されている。

（4）抗ヒトVEGF受容体Flt-1 マウスモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖をコードするcDNAの可変領域の塩基配列の決定

参考例1の1（3）で得られた各抗ヒトVEGF受容体Flt-1 マウスモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖をコードするcDNAの可変領域（以下、V領域と表記する）の塩基配列を、得られたプラスミドの0.1 $\mu$ gを用いてBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（アプライド バイオシステムズ社製）に添付の説明書に従って反応後、ABI PRISM377（アプライド バイオシステムズ社製）により電気泳動し、決定した。決定したそれぞれのcDNAの塩基配列より、KM1732およびKM1750のH鎖のV領域（以下、VHと表記する）およびL鎖のV領域（以下、VLと表記する）のアミノ酸配列を決定した。配列番号1にKM1732のVH、配列番号2にKM1732のVL、配列番号3にKM1750のVH、配列番号4にKM1750のVLのそれぞれの塩基配列を、配列番号82にKM1732のVH、配列番号83にKM1732のVL、配列番号84にKM1750のVH、配列番号85にKM1750のVLのそれぞれのアミノ酸配列を示す。

（5）抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖のCDR配列の同定

参考例1の1（4）で決定した各抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列より、それぞれのVHおよびVLのCDR配列を既知の抗体のV領域のアミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）と比較することによって同定した。配列番号5、6および7にKM1732のVHのCDR1、CDR2およびCDR3、配列番号8、9および10にKM1732のVLのCDR1、CDR2およびCDR3、配列番号11、12および13にKM1750のVHのCDR1、CDR2およびCDR3、配列番号14、15および16にKM1750のVLのCDR1、CDR2およびCDR3のそれぞれのアミノ酸配列を示す。

## 2. 抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体の製造

ヒトVEGF受容体Flt-1に対する中和活性を有する抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732およびKM1750に由来する、抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体KM2532およびKM2550を以下のようにして製造した。

(1) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体の発現ベクターpKANTEX1732の構築

W097/10354に記載のヒト化抗体発現用タンデムカセットベクターpKANTEX93および参考例1の1項で得られたプラスミドKM1732HA2およびKM1732L2-1を用いて抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体の発現ベクターpKANTEX1732を以下のようにして構築した。

プラスミドpBluescript SK(-) (ストラタジーン社製) の3 $\mu$ gを10mM トリス-塩酸 (pH7.5)、10mM 塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、100 $\mu$ g/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのApaI-NotI断片を約2 $\mu$ g回収した。次に、プラスミドKM1732HA2の5 $\mu$ gを20mM トリス-酢酸 (pH7.9)、10mM 酢酸マグネシウム、50mM 酢酸カリウム、1mM DTTおよび100 $\mu$ g/ml 牛血清アルブミン (以下、BSA と表記する) からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NlaIV (ニューイングランドバイオラプズ社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、100 $\mu$ g/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製) を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.41kbのNlaIV-NotI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。次に、配列番号17、18に記載の塩基配列を有する合成DNAを合成し (サワディー・テクノロジー社製)、各合成DNAの0.3 $\mu$ gずつを15 $\mu$ lの滅菌水に加え、65°Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、10倍緩衝液[500mM トリス-塩酸 (pH7.6)、100mM 塩化マグネシウム、50mM DTT]2 $\mu$ lと10mM ATP 2 $\mu$ l を加え、更に10単位のT4 polynucleotide kinase (宝酒造社製) を加えて37°Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

上記で得られたプラスミドpBluescript SK(-)由来のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gとプラスミドKM1732HA2由来のNlaIV-NotI断片0.1 $\mu$ gとリン酸化合成DNA0.05 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用い



て使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、第14図に示したプラスミドpBS1732Hを得た。

次に、W097/10354に記載のプラスミドphKM1259LV0の3 $\mu$ gを50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのEcoRI-SplI断片を約2 $\mu$ g回収した。次に、プラスミドKM1732L2-1の5 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化マグネシウム、1mM DTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素MboII（東洋紡績社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.38kbのMboII-EcoRI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。次に、配列番号19、20に記載の塩基配列を有する合成DNAを合成し（サウディ・テクノロジー社製）、各合成DNAの0.3 $\mu$ gずつを15 $\mu$ lの滅菌水に加え、65°Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、10倍緩衝液[500mM トリス-塩酸（pH7.6）、100mM 塩化マグネシウム、50mM DTT]2 $\mu$ lと10mM ATP 2 $\mu$ lを加え、更に10単位のT4 polynucleotide kinase（宝酒造社製）を加えて37°Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

上記で得られたプラスミドphKM1259LV0由来のEcoRI-SplI断片0.1 $\mu$ g、プラスミドKM1732L2-1由来のMboII-EcoRI断片0.1 $\mu$ gおよびリン酸化合成DNA0.05 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、第15図に示したプラスミドpBS1732Lを得た。

次に、ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の3 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 $\mu$ g/ml BSAおよび0.01% トライトンX-10

0 からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約12.75kbのApaI-NotI断片を約1 $\mu$ g回収した。次に、上記で得られたプラスミドpBS1732Hの5 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 $\mu$ g/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.46kbのApaI-NotI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。

上記で得られたヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93由来のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gとプラスミドpBS1732H由来のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、第16図に示したプラスミドpKANTEX1732Hを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX1732Hの3 $\mu$ gを50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約13.20kbのEcoRI-SplI断片を約1 $\mu$ g回収した。次に、上記で得られたプラスミドpBS1732Lの5 $\mu$ gを50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbのEcoRI-SplI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。

上記で得られたプラスミドpKANTEX1732H由来のEcoRI-SplI断片0.1 $\mu$ g、プラスミドpBS1732L由来のEcoRI-SplI断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株（東洋

紡績社製)を形質転換し、第17図に示したプラスミドpKANTEX1732を得た。

## (2) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体の発現ベクターpKANTEX1750の構築

W097/10354に記載のヒト化抗体発現用タンデムカセットベクターpKANTEX93および参考例1の1項で得られたプラスミドKM1750H2-1およびKM1750L3-1を用いて抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体の発現ベクターpKANTEX1750を以下のようにして構築した。

プラスミドKM1750H2-1の5 $\mu$ gを33mMトリス-酢酸 (pH7.9)、10mM酢酸マグネシウム、66mM酢酸カリウムおよび100 $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素Alw26I (ニューイングランドバイオラプス社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTT、100 $\mu$ g/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.41kbのAlw26I-NotI 断片を約0.5  $\mu$ g回収した。次に、配列番号21、22に記載の塩基配列を有する合成DNAを合成し(サワディー・テクノロジー社製)、各合成DNAの0.3 $\mu$ gずつを15 $\mu$ lの滅菌水に加え、65°Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、10倍緩衝液 [500mMトリス-塩酸 (pH7.6)、100mM 塩化マグネシウム、50mM DTT]2 $\mu$ lと10mM ATP 2 $\mu$ lを加え、更に10単位のT4 polynucleotide kinase (宝酒造社製)を加えて37°Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

参考例1の2(1)で得られたプラスミドpBluescript SK(-)由来のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gとプラスミドKM1750H2-1由来のAlw26I-NotI断片0.1 $\mu$ gとリン酸化合成DNA0.05 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株 (東洋紡績社製)を形質転換し、第18図に示したプラスミドpBS1750Hを得た。

次に、プラスミドKM1750L3-1の5 $\mu$ gを100mM トリス-塩酸 (pH8.8)、440mM 塩化ナトリウム、12mM塩化マグネシウム、14mM 2-メルカプトエタノールおよび200 $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素MaeII (ペーリンガー・マンハイム社製)を加えて50°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mMトリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化

マグネシウム、1mM DTTからなる緩衝液10 $\mu$ l に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.38kbのMaeII-EcoRI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。次に、配列番号23、24に記載の塩基配列を有する合成DNAを合成し（サワディー・テクノロジー社製）、各合成DNAの0.3 $\mu$ gずつを15 $\mu$ lの滅菌水に加え、65°Cで5分間加熱した。該反応液を室温にて30分間放置した後、10倍緩衝液[500mM トリス-塩酸（pH7.6）、100mM 塩化マグネシウム、50mM DTT]2 $\mu$ l と10mM ATP 2 $\mu$ l を加え、更に10単位のT4 polynucleotide kinase（宝酒造社製）を加えて37°Cで30分間反応させ、5'末端をリン酸化した。

参考例1の2（1）で得られたプラスミドpHKM1259LV0由来のEcoRI-SplI断片0.1 $\mu$ g、プラスミドKM1750L3-1由来のMaeII-EcoRI断片0.1 $\mu$ gおよびリン酸化合成DNA 0.05 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、第19図に示したプラスミドpBS1750Lを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpBS1750Hの5 $\mu$ gを10mM トリス-塩酸（pH7.5）、10mM 塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、100 $\mu$ g/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.46kbのApaI-NotI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。

参考例1の2（1）で得られたヒト化抗体発現用タンデムカセットベクターpKANTEX93由来のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gとプラスミドpBS1750H由来のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、第20図に示したプラスミドpKANTEX1750Hを得た。

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX1750Hの3 $\mu$ gを50mM トリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）

および制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約13.20kbのEcoRI-SplI断片を約1 $\mu$ g回収した。次に、上記で得られたプラスミドpBS1750Lの5 $\mu$ gを50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbのEcoRI-SplI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。

上記で得られたプラスミドpKANTEX1750H由来のEcoRI-SplI断片0.1 $\mu$ g、プラスミドpBS1750L由来のEcoRI-SplI断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA 溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、第21図に示したプラスミドpKANTEX1750を得た。

（3）pKANTEX1732およびpKANTEX1750を用いた抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体のラットミエローマYB2/0細胞（ATCC CRL1581）での発現

YB2/0細胞への抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体発現ベクターpKANTEX1732およびpKANTEX1750の導入は宮地らの方法に従い、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] にて行った。

参考例1の2項（1）、（2）で得られたpKANTEX1732およびpKANTEX1750の5 $\mu$ gを4 $\times$ 10<sup>6</sup>個のYB2/0細胞へ導入後、40mlのRPMI1640-FCS（10）培地 [牛胎児血清（FCS）を10% 含むRPMI1640培地（日水製薬社製）] に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート（スミロン社製）に200 $\mu$ l/ウェルずつ分注した。5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、24時間培養後、ジェネティシン（以下、G418と表記する、ギブコ社製）を0.5mg/mlになるように添加してさらに1~2週間培養した。G418耐性を有する形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体の活性を以下に示す酵素免疫測定法により測定した。

#### 酵素免疫測定法

可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nは、Tanakaらの方法 [Japanese Journal of Cancer Research, 88, 867 (1997)] に従い調製した。96ウェルのEIA用プレート（グライナー社製）に、PBSで希釈した1 $\mu$ g/mlの可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nを50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%

BSAを含むPBS（以下、1%BSA-PBSと表記する）を100 $\mu$ l/ウェル加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清を50 $\mu$ l/ウェルで分注し、室温で1時間反応させた。0.05% tween 20を含むPBS（以下、0.05% tween-PBSと表記する）で洗浄後、1%BSA-PBSにて3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG 抗体（アメリカン コーレックス社製）を50 $\mu$ l/ウェルで加えて室温で1時間反応させ、0.05% tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 [2,2-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸）アンモニウム] を50 $\mu$ l/ウェルで加えて発色させ、OD415nmの吸光度をE<sub>max</sub>（モレキュラー・デバイシーズ社製）を用いて測定した。

培養上清中に抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体の活性が認められた形質転換株について、生産性を上げる目的で、0.5mg/ml G418および50nMメソトレキセート（以下、MTXと表記する、シグマ社製）を含むRPMI1640-FCS（10）培地に懸濁し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、1～2週間培養し、50nM MTX耐性を有する形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体の活性を上記の酵素免疫測定法により測定した。活性の認められた形質転換株については、上記と同様の培養方法により、さらにMTX 濃度を100nM、200nMと上げて行き、0.5mg/ml G418および200nM MTXを含むRPMI1640-FCS（10）培地で増殖可能でかつ、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株については2回の限界希釈法によるクローニングを経て、最終的な抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換細胞株とした。発現ベクターpKANTEX1732を導入して得られた形質転換細胞株、すなわち、抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732由来の抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株の例としてはKM2532があげられ、それが生産する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体をKM2532と命名した。また、発現ベクターpKANTEX1750を導入して得られた形質転換細胞株、すなわち抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1750由来の抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株の例としてはKM2550があげられ、それが生産する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体をKM2550と命名した。得られた各形質転換細胞クローンの抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体の生産性は約5 $\mu$ g/10<sup>6</sup>細胞/24時間であった。

（4）抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体の培養上清からの精製

参考例 1 の 2 ( 3 ) で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体生産株 KM2532 および KM2550 を 0.5mg/ml G418 および 200nM MTX 含む GIT 培地 ( 日本製薬社製 ) に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/ml となるように懸濁し、175cm<sup>2</sup> フラスコ ( グライナー社製 ) に 200ml ずつ計 5 本に分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、5~7 日間培養し、コンフルエントになった時点で各培養上清約 1.0L を回収した。カラムに約 1ml のプロセップ A ( バイオプロセッシング社製 ) を充填し、10ml の 1M グリシン-0.15M NaCl ( pH8.6 ) を用いて 1ml/分の流速でカラムを洗浄した。洗浄後、上記のように調製した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 を含む培養上清をそれぞれ 1700ml、1800ml を 70ml/時の流速でプロセップ A カラムに通塔した。さらに 10ml の 1M グリシン-0.15M NaCl ( pH8.6 ) を用いて 1ml/分の流速で洗浄した後、pH6、pH5 および pH4 の 50mM クエン酸緩衝液各 4ml で段階的に洗浄し、50mM クエン酸緩衝液 ( pH3.0 ) を 7ml 通塔してヒト型キメラ抗体を溶出した。その結果、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 がそれぞれ 0.4mg、0.3mg 得られた。

精製した抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 は、SDS-PAGE 法で解析した。SDS-PAGE は公知の方法 [Anticancer Research, 12, 11 21 (1992) ] に従った。ゲルには 5~20% グラジエントゲル ( アトー社製 ) を、分子量マーカーとしては低分子量タンパク質分子量マーカー「第一」II、高分子量タンパク質分子量マーカー「第一」III ( 第一化学薬品社製 ) を用い、還元および非還元条件下でレーンあたりのタンパク質量として 2.5μg の抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 をそれぞれ泳動し、クーマシーブリリアントブルーにて染色した。その結果第 22 図に示した。ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 は、非還元条件下では分子量約 150 キロダルトンに IgG のバンドが認められ、還元条件下では約 50 キロダルトンに H 鎖のバンドが、約 25 キロダルトンに L 鎖のバンドが認められた。IgG 型の抗体は、還元条件下では分子間ジスルフィド結合が切断され、それぞれ 2 本の H 鎖および L 鎖に分解し、非還元条件下ではそれぞれ 2 本の H 鎖および L 鎖より構成される分子量 150 キロダルトンの分子として存在することと一致し、ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 は正しい構造の抗体分子であることが示された。

( 5 ) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体のヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対する結合活性

精製抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト型キメラ抗体 KM2532 および KM2550 のヒト VEG

F受容体Flt-1に対する結合活性を以下の手順に従い、確認した。

可溶性ヒトFlt-1 7NはTanakaらの方法 [Japanese Journal of Cancer Research, 88, 867 (1997)] に従い調製した。

まず、酵素免疫測定法を用いて96ウェルのEIA用プレートに吸着させる可溶性ヒトFlt-1 7N量を固定し、添加するヒト型キメラ抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した。96ウェルのEIA用プレート（グライナー社製）に、PBSで希釈した1 $\mu$ g/mlの可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nを50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100 $\mu$ l/ウェル加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、0.152 ~ 333ng/mlの精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532およびKM2550を50 $\mu$ l/ウェルで分注し、室温で1時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSにて3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG 抗体（アメリカン コーレックス社製）を50 $\mu$ l/ウェルで加えて室温で1時間反応させ、0.05% tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 [2,2-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸）アンモニウム] を50 $\mu$ l/ウェルで加えて発色させ、OD415nmの吸光度をE max（モレキュラー・デバイシーズ社製）を用いて測定した。

その結果を第23（A）図に示す。抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550は抗体濃度依存的にヒトVEGF受容体Flt-1 7Nに結合した。また、抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550の結合活性はほぼ同等であった。

次に、酵素免疫測定法を用いて96ウェルのEIA 用プレートに吸着させる可溶性ヒトFlt-1 7N量を変化させてヒト型キメラ抗体の結合活性を検討した。96ウェルのEIA用プレート（グライナー社製）に、PBSで希釈した0.04~10 $\mu$ g/mlの可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nを50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100 $\mu$ l/ウェル加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、10 $\mu$ g/mlの精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532およびKM2550を50 $\mu$ l/ウェルで分注し、室温で1時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSにて3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG 抗体（アメリカン コーレックス社製）を50 $\mu$ l/ウェルで加えて室温で1時間反応させ、0.05% tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 [2,2-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸）アンモニウム] を50 $\mu$ l/ウェルで加えて発色させ、OD415nmの吸光度をE max（モ



レキュラー・デバイシーズ社製)を用いて測定した。

その結果を第23(B)図に示す。抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550はプレートに吸着させた可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nの濃度に依存した結合活性を示した。また、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550の結合活性はほぼ同等であった。

次に、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体によるヒトVEGFとヒトVEGF受容体Flt-1の結合阻害活性を以下のようにして検討した。96ウェル・マルチスクリーン-IPプレート(ミリボア社製)にメタノールを100 $\mu$ l/ウェルで分注し、プレート底部のPVDF膜を親水化した。水で洗浄後、PBSで0.2  $\mu$ g/mlの濃度に希釈した可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nを50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを50 $\mu$ l/ウェルに加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をブロックした。PBSで洗浄後、1%BSA-PBS溶液で希釈し0.004~2 $\mu$ g/mlの精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550および精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732、KM1750を50 $\mu$ l/ウェルで分注し、さらに、3ng/mlの $^{125}$ I標識ヒトVEGF(アマシャム社製)を50 $\mu$ l/ウェルで加え室温で1.5時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、50 $^{\circ}$ Cにてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-0(パッカード社製)を30 $\mu$ l/ウェルで加え、トップカウント(パッカード社製)を用いて、各ウェルに結合した $^{125}$ I標識ヒトVEGFの放射活性を測定した。その結果を第24図に示す。第24図に示したように抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532およびKM2550は抗体濃度依存的にヒトVEGFとヒトVEGF受容体Flt-1の結合を阻害した。また、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532およびKM2550は、抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732およびKM1750と同等のヒトVEGFとヒトVEGF受容体Flt-1の結合阻害活性を示し、ヒト型キメラ抗体はマウスモノクローナル抗体の活性を保持していることが示された。

(6) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体の認識するエピトープの解析

(6-1) 可溶性ヒトVEGF受容体KDR 7N、可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2の調製

可溶性ヒトVEGF受容体KDR 7N、可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-17N.K2を以下のようにして調製した。

(6-2) 可溶性ヒトVEGF受容体KDR 7N発現ベクターの構築

ヒトVEGF受容体KDRのシグナルペプチドを構成する19アミノ酸及び成熟体の

N末端アミノ酸から738番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体KDR断片（以下、可溶性ヒトVEGF受容体KDR 7Nと称す）及びリンカー由来の2アミノ酸残基を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。

可溶性ヒトVEGF受容体KDR 7Nは、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの細胞外領域のN末端側から7個のイムノグロブリン様部位より構成される。

ヒトVEGF受容体KDRの完全長cDNAをコードするcDNAクローンBCMGS-neo-KDR [Cell Growth & Differentiation, 7, 213 (1996)] をEcoRIで切断し、KDRの細胞外領域及び膜結合領域をコードする約2.8 kbの断片をpUC18のEcoRI部位に組み込むことによって、pUC-KDRを作製した。pUC-KDRをXhoIで切断し、Klenow処理後、XbaIリンカー（配列番号53）を挿入することによってpUC-KDR-Xbを作製した。pUC-KDR-XbのXbaI-BamHI (2.3 kbp) 断片をpBluescriptII KS(+)のXbaI/BamHI部位に挿入した後、SphI-BamHI (5.2kbp) 断片を調製し、SnaBI部位を含む合成リンカー（配列番号54及び配列番号55）を挿入し、pBS-KDR-Xb-Sを作製した。

pBS-KDR-Xb-SをSnaBI/BamHIで切断し、終止コドンとNotI部位とを含む合成リンカー（配列番号56及び配列番号57）を組み込み、pBS-KDR(Xb)-S-Nを作製した。pBS-KDR-Xb-S-NのXbaI-NotI (2.3kb) 断片をバキュロウイルス組み換えpVL139 3プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流5'側XbaI及び3'側NotI部位に組み込み、可溶性ヒトVEGF受容体KDR 7N発現ベクターpVL-KDR-7Nを作製した。

### （6-3）可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2発現ベクターの構築

可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1のシグナル配列を含むN末端から750番目に相当する可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7Nのうち、N末端から2番目のイムノグロブリン様部位に相当する、100番目のアミノ酸から204番目のアミノ酸を、それぞれ2アミノ酸からなるリンカー(Gly-Ala, Gly-Thr)を介して、可溶性ヒトVEGF受容体KDRの2番目のイムノグロブリン様部位に相当する、95番目のアミノ酸から199番目のアミノ酸に置換したキメラタンパク質Flt-1.K2を発現させるためのベクターを以下の手順で作製した。

ヒトflt-1cDNA [Oncogene, 5, 519 (1990)] のEcoRI/HindIII (1.9 kb) 断片をベクターM13mp1のEcoRI/HindIIIに挿入し、pM13-fltを作製した。pM13-fltを大腸菌XL1Blueに感染させ、宝酒造製の部位特異的変異導入用キットMutanK

添付のマニュアルに従って、培養上清よりssDNAを調製した。本ssDNAを鋳型として、56塩基から成るオリゴヌクレオチド（配列番号58）及び部位特異的変異導入用キットMutanK（宝酒造製）を用い、宝酒造製の部位特異的変異導入用キットMutanK添付のマニュアルに従って部位特異的変異を行い、Flt-1の細胞外領域の2番目のイムノグロブリン様部位をコードする領域を欠失させた変異Flt-1遺伝子を運ぶプラスミド（pM13-flt'-D2N）を作製した。次に、BCMGSneo-KDR [Cell Growth and Diff., 7, 213, (1996)] DNA 10ngを鋳型として用い、配列番号59及び配列番号60に示した塩基配列を有するプライマー各10 pmol、TaqDNAポリメラーゼバッファー、及び、10mMデオキシヌクレオチド三リン酸を含む溶液100mlに2.5 unitsのTaqDNAポリメラーゼを添加し、PCR反応を行った。反応は、95°Cで90秒間、50°Cで90秒間、72°Cで90秒間の反応を30回繰り返し、増幅した、KDRの細胞外領域のN末端側から2番目のイムノグロブリン様部位をコードするDNA断片を回収した。該DNA断片をNarI/KpnIで切断し、340bpのNarI/KpnI断片を得た。該DNA断片及び、pM13-flt'-D2NのSmaI/NarI (0.5kb)断片を、pBluescriptIIのSmaI/KpnI部位に挿入し、pBS-flt-1'-KDR2Nを作製した。pBS-flt-1'-KDR2NのBamH/KpnI(0.8kb)断片、pM13-flt'-D2NのKpnI/MunI (80b)断片、及び、pVL-flt-1のMunI/NotI (1.5kb)断片を、pVL1393のBamHII/NotI部位に挿入し、Flt-1.K2遺伝子を運ぶプラスミドPVL-fkfを作製した。

（6-4）昆虫細胞による可溶性ヒトVEGF受容体KDR 7Nおよび可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2発現を行うための組み換えウィルスの作製

昆虫細胞による蛋白質の生産には目的遺伝子を組み込んだ組み換えウィルスの作製が必要であるが、その作製にはトランスファーベクターと呼ばれる目的蛋白質をコードするcDNAを特殊なプラスミドに組み込む過程と野生型ウィルスとトランスファーベクターを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組み換えにより組み換えウィルスを取得する過程を経る。以上の過程をファーマンジェン社製バキュロゴールドスターターキット（製品番号PM-21001K）を用いてそのマニュアルに従い以下の手順で行った。

TMN-FHインセクトメディウム（ファーマンジェン社製）にて培養した昆虫細胞Sf9（ファーマンジェン社製）に線状バキュロウィルスDNA [バキュロゴールド・バキュロウィルスDNA(BaculoGold baculovirus DNA)、ファーマンジェン社製]および作製したトランスファーベクターDNAをリポフェクション法にて導入す

ること〔蛋白質核酸酵素、37, 2701 (1992)〕により、組み換えバキュロウィルスを以下のようにして作製した。

(6-2)で作製した発現ベクターの $1\mu\text{g}$ と線状バキュロウィルスDNAの $20\text{ng}$ とを $12\mu\text{l}$ の蒸留水に溶解し、さらにリポフェクチン $6\mu\text{l}$ と蒸留水 $6\mu\text{l}$ とを混和したものを加え室温で15分間放置した。一方Sf9細胞 $1\times 10^6$ 個を $2\text{ml}$ のSf900-II培地〔ギブコ(Gibco)社製〕に懸濁し、直径 $35\text{mm}$ の細胞培養用プラスチックシャーレに入れた。ここに上記のプラスミドDNA、線状バキュロウィルスDNAおよびリポフェクチン混和溶液全量を加え $27^\circ\text{C}$ で3日間培養後、組み換えウィルスを含む培養上清 $1\text{ml}$ を採取した。シャーレには新たにSf900-II培地 $1\text{ml}$ を加え、さらに $27^\circ\text{C}$ で3日間培養し組み換えウィルスを含む培養上清をさらに $1.5\text{ml}$ 得た。さらに、(6-3)で作製した発現ベクターを用い同様の操作を行った。

次に蛋白質発現に用いるため、得られた組み換えウィルスを各々、以下の手順で増殖させた。

Sf9細胞 $2\times 10^7$ 個を $10\text{ml}$ のSf900-II培地に懸濁し、 $175\text{cm}^2$ フラスコ(グライナー社製)に入れて室温で1時間放置して細胞をフラスコに付着させた。放置後上清を除き新たに $15\text{ml}$ のTMN-FHインセクトメディウムと上記の組み換えウィルスを含む培養上清のうち $1\text{ml}$ を加え $27^\circ\text{C}$ で3日間培養した。培養後上清を $1,500\times g$ で10分間遠心分離して細胞を除き、蛋白質発現に使用する組み換えウィルス溶液を得た。

得られた組み換えウィルス溶液についてウィルスの力価をバキュロゴールドスターターキット・マニュアル(ファーマンジェン社製)に記載の方法で算定した。

Sf9細胞 $6\times 10^6$ 個を $4\text{ml}$ のSf900-II培地に懸濁し、直径 $60\text{mm}$ の細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で1時間放置して細胞をシャーレに付着させた。次に上清を除き新たにSf900-II培地 $400\mu\text{l}$ とSf900-II培地で1000倍に希釈した上記組み換えウィルス溶液を加え室温で1時間放置した後、培地を除き $5\text{ml}$ の1%低融点アガロース〔アガーブランク・アガロース(Agarplaque Agarose)、ファーマンジェン社製〕を含む培地(滅菌した $1\text{ml}$ の5%アガーブランクプラス・アガロース水溶液と $4\text{ml}$ のTMN-FHインセクトメディウムを混和し、 $42^\circ\text{C}$ に保温したもの)を該シャーレに流し込んだ。室温で15分間放置した後、乾燥を防ぐためビニルテープをシャーレに巻き、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、 $27^\circ\text{C}$ で6日間培養した。該シャーレに0.01% ニュートラルレッドを含

むPBS1mlを加えさらに1日間培養した後、出現したプラークの数を数えた。以上の操作より該組み換えウィルス溶液はいずれも約 $1 \times 10^7$ プラークフォーミングユニット（以下、PFUと称す）/mlのウィルスを含んでいることがわかった。

（6-5）昆虫細胞における可溶性ヒトVEGF受容体KDR 7N、可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2の発現および精製

可溶性ヒトVEGF受容体KDR 7Nおよび可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2は以下のようにして得た。High Five細胞 $4 \times 10^7$ 個を $175 \text{ cm}^2$ フラスコ（グライナー社製）中のEX-CELLTM400培地（JRH Bioscience社製）30mlに懸濁し、室温で1時間放置し、フラスコに付着させた。（6-3）および（6-4）で得られたトランスファクター由来の組み換えウィルスを約 $1 \sim 3 \times 10^8$ PFU /mlの濃度で含む溶液を1ml加え、室温で2時間感染させた。培養上清を除き新たに30mlのEX-CELLTM400培地30mlを加え $27^\circ\text{C}$ にて3～4日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し $1,500 \times g$ で10分間遠心分離を行い上清を得た。

可溶性ヒトVEGF受容体KDR 7Nについては、以下のようにして精製した。

50mlのDEAE-Sepharose CL-6B(Pharmacia Biotech社製)を充填したカラムが液の入口側に、40mlのHeparin Sepharose CL-6B(Pharmacia Biotech社製)を充填したカラムが出口側になるように直列に接続し、300mlの20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8)で洗浄した。洗浄後、可溶性ヒトVEGF受容体KDRを含む培養液400～800mlを50～100ml/時の流速で通塔した。更に、300mlの20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8)で洗浄した後、Heparin Sepharose CL-6Bカラムのみに400mlの0～1M NaCl/20mMリン酸ナトリウム緩衝液にて連続濃度勾配をかけ、吸着蛋白質の溶出を行った。溶出液は7mlずつ分画し、各分画に含まれる蛋白質をSDS-PAGEにて解析し、可溶性ヒトVEGF受容体KDR 7Nを含む分画を60～80ml回収した。回収した精製画分はセントリプレップ10（アミコン社製）を用いて濃縮し、可溶性ヒトVEGF受容体KDR 7Nを溶液として4.8ml（蛋白質濃度は $815 \mu\text{g/ml}$ 、純度は70～80%）得た。

可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2については、以下のように精製した。

カラムに約20mlのヘパリンーセファロースCL-6B ゲル [ファルマシア・バイオテック(Pharmacia Biotech) AB社製] を充填し、100mlの20mMトリスー塩酸(pH7.5) 緩衝液を用いて0.5ml/分の流速でカラムを洗浄した。洗浄後、上記のように調製した可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2を含む培養

液900mlを0.5ml/分の流速でヘパリンーセファロースCL-6B カラムに通塔した。さらに100mlの20mMトリスー塩酸(pH7.5)を用いて0.5ml/分の流速で洗浄した後、濃度勾配が0M~1.5MのNaCl含有20mMトリスー塩酸(pH7.5)からなる緩衝液を200 ml通塔し、ヘパリンーセファロースに吸着した蛋白質の溶出を行うと共に8 mlずつ溶出液を分画した。各分画に含まれる蛋白をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて解析し、可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2を含む分画を50~70ml回収し、セントリプレップ10 (アミコン社製)を用いて濃縮した。濃縮後、可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2を溶液としてそれぞれ5.8ml (蛋白濃度は588 $\mu$ g/ml、純度65~75%) 得た。

#### (6-6) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体の認識するエピトープの解析

精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体KM2532およびKM2550の認識するエピトープを以下の手順に従い解析した。

可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7N (シグナル配列を含むN末端アミノ酸から750番目に相当)、可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 3N (シグナル配列を含むN末端アミノ酸から338番目に相当)、可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 2N (シグナル配列を含むN末端アミノ酸から223番目に相当)はTanakaらの方法 [Japanese Journal of Cancer Research, 88, 867 (1997)] に従い調製した。可溶性ヒト受容体KDR 7N (シグナル配列を含まないN末端アミノ酸から738番目に相当)、可溶性ヒトVEGF受容体キメラタンパク質Flt-1 7N.K2 (ヒトFlt-1 7Nのアミノ酸100~204番目をリンカーを介してヒトKDRのアミノ酸95~199番目に変換したもの)は(6-5)に従い調製した。実験に用いた可溶性ヒトVEGF受容体各種誘導体の模式図は第34図に示した。

まず、酵素免疫測定法を用いて抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732、KM1750および抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550の反応性を比較した。96ウェルのEIA用プレート (グライナー社製) に、PBSで希釈した4 $\mu$ g/mlのFlt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2、KDR 7Nをそれぞれ50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100 $\mu$ l/ウェル加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、0.1 $\mu$ g/mlの精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732またはKM1750、あるいは、精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532またはKM2550を50 $\mu$ l/ウェルで分注し、

室温で1時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSにて400倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG抗体（ダコ社製）あるいは3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体（アメリカン コーレックス社製）を50 $\mu$ l/ウェルで加えて室温で1時間反応させ、0.05% tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 [2,2-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム] を50 $\mu$ l/ウェルで加えて発色させ、OD415nmの吸光度をE<sub>max</sub>（モレキュラー・デバイシーズ社製）を用いて測定した。

その結果を第32図に示す。抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732、KM1750および抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550はFlt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2Nに結合し、Flt-1 7N.K2、KDR 7Nには結合しなかった。従って、抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732、KM1750および抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550の認識するエピトープは、ヒトFlt-1のN末端アミノ酸から100～204番目までの領域に含まれることが示された。

次に、酵素免疫測定法を用いて96ウェルのEIA用プレートに吸着させるFlt-17N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2、KDR 7N量を一定にし、添加するヒト型キメラ抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した。96ウェルのEIA用プレート（グライナー社製）に、PBSで希釈した4 $\mu$ g/mlのFlt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2、KDR 7Nをそれぞれ50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100 $\mu$ l/ウェル加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、0.0152～100ng/mlの精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体KM2532またはKM2550を50 $\mu$ l/ウェルで分注し、室温で1時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSで3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体（アメリカン コーレックス社製）を50 $\mu$ l/ウェルで加えて室温で1時間反応させ、0.05% tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 [2,2-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム] を50 $\mu$ l/ウェルで加えて発色させ、OD415nmの吸光度をE<sub>max</sub>（モレキュラー・デバイシーズ社製）を用いて測定した。

その結果を第33図（上図）に示す。抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550は抗体濃度依存的にFlt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2Nに結合し、Flt-1 7N.K2、KDR 7Nには結合しなかった。また、抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550の結合活性はほぼ同等であった。

次に、酵素免疫測定法を用いて96ウェルのEIA 用プレートに吸着させるFlt-17N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2、KDR 7N量を変化させてヒト型キメラ抗体の結合活性を検討した。96ウェルのEIA 用プレート（グライナー社製）に、PBSで希釈した0.041~10 $\mu$ g/mlの可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N、Flt-1 7N.K2、KDR 7Nをそれぞれ50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100 $\mu$ l/ウェル加え、室温で1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、5 $\mu$ g/mlの精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体KM2532またはKM2550をそれぞれ50 $\mu$ l/ウェルで分注し、室温で1時間反応させた。0.05% tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS にて3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG 抗体（アメリカン コーレックス社製）を50 $\mu$ l/ウェルで加えて室温で1時間反応させ、0.05% tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 [2,2-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸）アンモニウム] を50 $\mu$ l/ウェルで加えて発色させ、OD415nmの吸光度をE max（モレキュラー・デバイシーズ社製）を用いて測定した。

その結果を第33図（下図）に示す。抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550はプレートに吸着させた可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1 7N、Flt-13N、Flt-1 2Nの濃度に依存した結合活性を示し、Flt-1 7N.K2、KDR 7Nには反応しなかった。また、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550の結合活性はほぼ同等であった。

### 3. 抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型CDR 移植抗体の製造

ヒトVEGF受容体Flt-1に対する中和活性を有する抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732、KM1750および抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2532、KM2550と同等の活性を有する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体を以下のようにして製造した。

（1）既知のヒト抗体のVHの共通配列を基礎とする抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVHをコードするcDNAの構築

カバットらは[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991、以下同様]、既知の様々なヒト抗体のVHをそのアミノ酸配列の相同性からサブグループI~III(HSG I~III)に分類し、各サブグループ毎に共通配列を同定した。そこで、それら共通配列を基礎として抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR 移植抗体のVHのアミノ酸配列を設計する



こととした。まず、基礎とする共通配列を選択するために、各サブグループのヒト抗体のVHの共通配列のフレームワーク領域（以下、FRと表記する）のアミノ酸配列と抗ヒトVEGF受容体Flt-1 マウスモノクローナル抗体KM1732およびKM1750のVHのFRのアミノ酸配列との間の相同性を調べた（第1表）。

第 1 表

	HSGI	HSGII	HSGIII
KM1732	65.5	51.7	55.2
KM1750	67.8	49.4	54.0

その結果、KM1732、KM1750ともにサブグループI と最も相同性が高いことが確認され、サブグループIの共通配列を基礎として抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列を設計し、そのアミノ酸配列をコードするcDNAをポリメラーゼチェーンリアクション法（以下、PCR法と表記する）を用いて以下のようにして構築した。

まず、抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732のVHに由来する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR 移植抗体のVHをコードするcDNAの構築について以下に説明する。配列番号25～30の塩基配列を有する6本の合成DNAを合成した（サウディー・テクノロジー社製）。合成した各DNAを最終濃度が0.1 $\mu$ Mとなるように200 $\mu$ M dNTP（宝酒造社製）、0.5 $\mu$ M M13primer RV（宝酒造社製）、0.5 $\mu$ M M13primer M4（宝酒造社製）および2.5単位のTaKaRa Ex Taq DNA ポリメラーゼ（宝酒造社製）を含む1倍濃度のEx Taq緩衝液（宝酒造社製）50 $\mu$ lに加え、50 $\mu$ lの鉱油で覆い、DNAサーマルサイクラーPJ480（パーキン エルマー社製）にセットし、94 $^{\circ}$ Cにて2分間、55 $^{\circ}$ Cにて2分間、72 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを30サイクル行なった。該反応液をQIA quick PCR Purification Kit（キアジェン社製）を用いて添付の説明書に従い処理し、20 $\mu$ lの滅菌水で精製、溶出した。次に、得られた溶出液を10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネシウムおよび1mM DTTからなる緩衝液30 $\mu$ lに加え、更に20単位の制限酵素ApaI（宝

酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、100 $\mu$ g/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100 からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI (宝酒造社製)を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.44kbのApaI-NotI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。

参考例1の2(1)で得られたプラスミドpBluescript SK(-)由来のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gと上記で得られたPCR増幅断片のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製)を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株 (東洋紡績社製)を形質転換した。10個の形質転換大腸菌より各プラスミドを調製し、参考例1の1項(4)に記載の方法に従って、塩基配列を決定した結果、目的のアミノ酸配列をコードするcDNAを含む第25図に示したプラスミドphKM1732HV0を得た。phKM1732HV0に含まれる抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVH (以下、1732HV0と表記する)の塩基配列を配列番号31およびアミノ酸配列を配列番号86に示した。

抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1750のVHに由来する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVHをコードするcDNAの構築については、配列番号32~37の塩基配列を有する6本の合成DNA (サワディー・テクノロジー社製)を用いて上記と同様の反応を行い、図26に示した目的のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドphKM1750HV0を得た。phKM1750HV0に含まれる抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVH (以下、1750HV0と表記する)の塩基配列を配列番号38およびアミノ酸配列を配列番号87に示した。

(2) 既知のヒト抗体のVLの共通配列を基礎とする抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVLをコードするcDNAの構築

カバットらは既知の様々なヒト抗体のVLをそのアミノ酸配列の相同性からサブグループI~IV (HSG I ~IV) に分類し、各サブグループ毎に共通配列を同定した。そこで、それら共通配列を基礎として抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列を設計することとした。まず、基礎とする共通配列を選択するために、各サブグループのヒト抗体のVLの共通配列のFRのアミノ酸配列と抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732およびKM1750のVLのFRのアミノ酸配列との間の相同性を調べた (第2表)。

第 2 表

	HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
KM1732	66.2	57.5	62.5	63.8
KM1750	68.8	63.8	68.8	70.0

その結果、KM1732はサブグループIと最も高い相同性を示すこと、KM1750はサブグループIおよびIVとほぼ同等の高い相同性を示すことが確認され、それぞれサブグループI およびサブグループIVの共通配列を基礎として抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列を設計し、そのアミノ酸配列をコードするcDNAをPCR法を用いて以下のようにして構築した。

まず、抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732のVLに由来する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVLをコードするcDNAの構築について以下に説明する。配列番号39～44の塩基配列を有する6本の合成DNAを合成した（サワディー・テクノロジー社製）。合成した各DNAを最終濃度が0.1 $\mu$ Mとなるように200 $\mu$ M dNTP（宝酒造社製）、0.5 $\mu$ M M13primer RV（宝酒造社製）、0.5 $\mu$ M M13primer M4（宝酒造社製）および2.5単位のTaKaRa Ex Taq DNA ポリメラーゼ（宝酒造社製）を含む1倍濃度のEx Taq緩衝液（宝酒造社製）50 $\mu$ lに加え、50 $\mu$ lの鉱油で覆い、DNAサーマルサイクラーPJ480（パーキン エルマー社製）にセットし、94 $^{\circ}$ Cにて2分間、55 $^{\circ}$ Cにて2分間、72 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを30サイクル行なった。該反応液をQIA quick PCR Purification Kit（キアジェン社製）を用いて添付の説明書に従い処理し、20 $\mu$ l の滅菌水で精製し、溶出した。次に、得られた溶出液を50mMトリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液30 $\mu$ l に加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbのEcoRI-SplI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。

参考例1の2（1）で得られたプラスミドphKM1259LV0由来のEcoRI-SplI断片0.1 $\mu$ gと上記で得られたPCR増幅断片のEcoRI-SplI断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従

い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換した。10個の形質転換大腸菌より各プラスミドを調製し、参考例1の1項（4）に記載の方法に従って、塩基配列を決定した結果、目的のアミノ酸配列をコードするcDNAを含む第27図に示したプラスミドphKM1732LV0を得た。phKM1732LV0に含まれる抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR 移植抗体のVL（以下、1732LV0と表記する）の塩基配列を配列番号45およびアミノ酸配列を配列番号88に示した。

抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1750のVLに由来する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR 移植抗体のVLをコードするcDNAの構築については、ヒトサブグループIVの共通配列を基礎として利用する場合には配列番号46～51の塩基配列を有する6本の合成DNA（サワディー・テクノロジー社製）を用いて上記と同様の反応を行い、第28図に示した目的のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドphKM1750LV0(IV)を得た。phKM1750LV0(IV)に含まれる抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR 移植抗体のVL〔以下、1750LV0(IV)と表記する〕の塩基配列を配列番号52、およびアミノ酸配列を配列番号89に示した。ヒトサブグループIの共通配列を基礎として利用する場合には配列番号61～66の塩基配列を有する6本の合成DNA（サワディー・テクノロジー社製）を用いて上記と同様の反応を行い、第35図に示した目的のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドphKM1750LV0(I)を得た。phKM1750LV0(I)に含まれる抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR 移植抗体のVL〔以下、1750LV0(I)と表記する〕の塩基配列を配列番号67およびアミノ酸配列を配列番号90に示した。

（3）既知のヒト抗体のV領域の共通配列を基礎とした抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターの構築

W097/10354に記載のヒト化抗体発現用タンデムカセットベクターpKANTEX93および参考例1の3（1）、（2）で得られた抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAを含むプラスミドphKM1732HV0、phKM1732LV0、phKM1750HV0、phKM1750LV0(I)およびphKM1750LV0(IV)を用いて抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターを以下のようにして構築した。

まず、抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732に由来する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターの構築について以下に説明する。

プラスミドphKM1732HV0の5 $\mu$ gを10mMトリス-塩酸（pH7.5）、10mM塩化マグネ

シウムおよび1mM DTTからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素ApaI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、50mM トリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、100 $\mu$ g/ml BSAおよび0.01% トライトンX-100からなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素NotI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.44kbのApaI-NotI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。

参考例1の2（1）で得られたヒト化抗体発現用タンデムカセットベクターpKANTEX93由来のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gと上記で得られたプラスミドpKM1732HV0由来のApaI-NotI断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、第29図に示したプラスミドpKANTEX1732HV0を得た。

次に、得られたプラスミドpKANTEX1732HV0の3 $\mu$ gを50mM トリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約13.20kbのEcoRI-SplI断片を約1 $\mu$ g回収した。次に、プラスミドpKM1732LV0の5 $\mu$ gを50mM トリス-塩酸（pH7.5）、100mM 塩化ナトリウム、10mM 塩化マグネシウム、1mM DTTおよび100 $\mu$ g/ml BSAからなる緩衝液10 $\mu$ lに加え、更に10単位の制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素SplI（宝酒造社製）を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.39kbのEcoRI-SplI断片を約0.5 $\mu$ g回収した。

上記で得られたプラスミドpKANTEX1732HV0由来のEcoRI-SplI断片0.1 $\mu$ gとプラスミドpKM1732LV0由来のEcoRI-SplI断片0.1 $\mu$ gを全量10 $\mu$ lの滅菌水に加え、DNA ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて使用説明書に従い、連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、第30図に示した抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターpKANTEX1732HV0LV0を得た。

抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1750に由来する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターの構築についても、上記と同様の反応を行い、第31図および第36図に示した抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型C

DR移植抗体の発現ベクターpKANTEX1750HVOLV0(IV)およびpKANTEX1750HVOLV0(I)を得た。

4. 抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のV領域のFRのアミノ酸配列の解析とFRのアミノ酸を改変した改変型ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターの作製

抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732およびKM1750のV領域のコンピューター三次元構造モデルおよび参考例1の3項で製造した各抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のV領域のコンピューター三次元構造モデルを構築、比較検討することにより、各抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のV領域のFRのアミノ酸配列と各抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体のV領域のFRのアミノ酸配列の間で異なっているアミノ酸残基のうち、各抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のV領域のFRのアミノ酸配列においてヒトVEGF受容体Flt-1との結合に重要と考えられるアミノ酸残基の位置を同定することを検討した。その結果、抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1732に由来する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体については、VHにおいて配列番号86に記載のアミノ酸配列の24位のアラニン、27位のチロシン、40位のアラニン、67位のアルギニン、69位のスレオニン、70位のイソロイシン、82位のグルタミン酸、93位のバリンの位置が、VLにおいて配列番号88に記載のアミノ酸配列の39位のプロリン、45位のロイシン、46位のロイシン、69位のアスパラギン酸、70位のフェニルアラニンの位置がヒトVEGF受容体Flt-1との結合において重要な役割を果たしていることが考えられた。

また、抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1750に由来する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体については、VHにおいて配列番号87に記載のアミノ酸配列の3位のグルタミン、67位のアルギニン、82位のグルタミン酸、84位のセリン、95位のチロシンの位置が、VLにおいて配列番号90に記載のアミノ酸配列の17位のアスパラギン酸、18位のアルギニン、39位のプロリン、59位のセリン、69位のアスパラギン酸、70位のフェニルアラニンの位置がヒトVEGF受容体Flt-1との結合において重要な役割を果たしていることが考えられた。これらの事実は、上記で述べた抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の各アミノ酸残基の位置について、例えば、抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体の相当する位置に見い出されるアミノ酸残基への改変を行うことにより、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のヒトVEGF受容体Flt-1に対する結合活性を改変できることを示している。

(1) F Rのアミノ酸を改変した改変型ヒト型CDR移植抗体のV Hをコードするc D N Aの構築

抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1750に由来する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR 移植抗体のH鎖については、ヒトVEGF受容体Flt-1との結合において重要な役割を果たしていると考えられる上記に示した5つのアミノ酸残基の中で3残基(82位のグルタミン酸、84位のセリン、95位のチロシン)の位置が特に重要であると考えられるので、KM1750に見出される対応残基(82位のグルタミン、84位のア르기ニン、95位のフェニルアラニン)へ置換したアミノ酸配列をコードするcDNAをPCR法を用いて以下のようにして構築した。

配列番号68~73の塩基配列を有する6本の合成DNA(サワディー・テクノロジー社製)を用いてPCR法により約0.39kbのMroI-ApaI断片を回収した。

プラスミドphKM1750HV0を制限酵素ApaIおよびMroIで処理後、約3.04k bのApaI-MroI断片を回収し、上記で得られたPCR増幅断片を連結し、得られた組換えプラスミドDNA 溶液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株(東洋紡績社製)を形質転換した。10個の形質転換大腸菌より各プラスミドを調製し、参考例1の1項(4)に記載の方法に従って、塩基配列を決定した結果、目的のアミノ酸配列をコードするcDNAを含む第37図に示したプラスミドphKM1750HV3を得た。

phKM1750HV3に含まれる抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVH(以下、1750HV3と表記する)の塩基配列を配列番号74およびアミノ酸配列を配列番号91に示した。

(2) F Rのアミノ酸を改変した改変型ヒト型CDR移植抗体のV Lをコードするc D N Aの構築

抗ヒトVEGF受容体Flt-1マウスモノクローナル抗体KM1750に由来する抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR 移植抗体のL鎖については、ヒトVEGF受容体Flt-1との結合において重要な役割を果たしていると考えられる上記に示した6つのアミノ酸残基の中で4残基(17位のアスパラギン酸、18位のア르기ニン、69位のアスパラギン酸、70位のフェニルアラニン)の位置がKM1750LV0(I)においては特に重要であると考えられるので、KM1750に見出される対応残基(17位のグルタミン酸、18位のグルタミン酸、69位のフェニルアラニン、70位のチロシン)へ置換したアミノ酸配列をコードするcDNAをPCR法を用いて以下のようにして構築した。

配列番号75から80の塩基配列を有する6本の合成DNA(サワディー・テクノロジー

ジー社製)を用いて上記と同様の反応を行い、第38図に示した目的のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドphKM1750LV4を得た。phKM1750LV4に含まれる抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のVL(以下、1750LV4と表記する)の塩基配列を配列番号81およびアミノ酸配列を配列番号92に示した。

(3)FRのアミノ酸を改変した改変型ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターの構築

参考例1の4(3)で得られた抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAを含むプラスミドphKM1750HV3、phKM1750LV4、および、参考例1の3(1)、(2)で得られたプラスミドphKM1750HV0、phKM1750LV0(I)、phKM1750LV0(IV)を用いて、FRのアミノ酸を改変した改変型抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターについては、参考例1の3(3)に示した方法と同様の反応を行い、第39図、第40図、第41図および第42図に示した改変型抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の発現ベクターpKANTEX1750HV3LV0(I)、pKANTEX1750HV3LV0(IV)、pKANTEX1750HVOLV4、pKANTEX1750HV3LV4を得た。

KM1750マウスH鎖、KM1750HV0、KM1750HV3のアミノ酸配列を第47図に示した。KM1750マウスL鎖、KM1750LV0(I)、KM1750LV(IV)、KM1750LV4のアミノ酸配列を第48図に示した。

組換えプラスミドpHKM1750HV0を有する大腸菌DH5 $\alpha$ /pHKM1750HV0、組換えプラスミドpHKM1750HV3を有する大腸菌DH5 $\alpha$ /pHKM1750HV3、組換えプラスミドpHKM1750LV0(I)を有する大腸菌XL1-Blue/pHKM1750LV0(I)、組換えプラスミドpHKM1750LV0(IV)を有する大腸菌XL1-Blue/pHKM1750LV0(IV)、組換えプラスミドpHKM1750LV4を有する大腸菌DH5 $\alpha$ /pHKM1750LV4は、それぞれFERM BP-6719、FERM BP-6720、FERM BP-6716、FERM BP-6717、FERM BP-6718として、平成11年5月12日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されている。

#### 5. 抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の製造と活性評価

(1)pKANTEX1750HVOLV0(I)、pKANTEX1750HVOLV0(IV)、pKANTEX1750HV3LV0(I)、pKANTEX1750HV3LV0(IV)、pKANTEX1750HVOLV4およびpKANTEX1750HV3LV4を用いた抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体のラットミエローマYB2/0細胞(ATCC CRL1581)での発現

YB2/0細胞への抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体発現ベクターpKAN



TEX1750HV0LV0(I)、pKANTEX1750HV0LV0(IV)、pKANTEX1750HV3LV0(I)、pKANTEX1750HV3LV0(IV)、pKANTEX1750HV0LV4およびpKANTEX1750HV3LV4の導入は参考例1の1(1)に従い、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] にて行った。

参考例1の4項(3)で得られたpKANTEX1750HV0LV0(I)、pKANTEX1750HV0LV0(IV)、pKANTEX1750HV3LV0(I)、pKANTEX1750HV3LV0(IV)、pKANTEX1750HV0LV4およびpKANTEX1750HV3LV4のそれぞれ5 $\mu$ gを4 $\times 10^6$ 個のYB2/0細胞へ導入後、40mlのRPMI1640-FCS(10)培地[牛胎児血清(FCS)を10%含むRPMI1640培地(日水製薬社製)]に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート(スミロン社製)に200 $\mu$ l/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、24時間培養後、G418(ギブコ社製)を0.5mg/mlになるように添加してさらに1~2週間培養した。G418耐性を有する形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型CDR移抗体の活性を参考例1の2項(3)に示した酵素免疫測定法により測定した。

培養上清中に抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型CDR移植抗体の活性が認められた形質転換株については2回の限界希釈法によるクローニングを経て、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体を生産する形質転換細胞株とした。発現ベクターpKANTEX1750HV0LV0(I)、pKANTEX1750HV0LV0(IV)、pKANTEX1750HV3LV0(I)、pKANTEX1750HV3LV0(IV)、pKANTEX1750HV0LV4、pKANTEX1750HV3LV4をそれぞれ導入して得られた形質転換株、すなわち、抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体KM1750由来の抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体を生産する形質転換株の例としてはそれぞれKM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555があげられ、それが生産する抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型CDR移植抗体をそれぞれKM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555と命名した。得られた各形質転換細胞クローンの抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体の生産性は約0.1~1 $\mu$ g/mlであった。

## (2) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型CDR移植抗体の培養上清からの精製

参考例1の5(1)で得られた抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体生産株KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555を0.5mg/ml G418を含むGIT培地(日本製薬社製)に1~2 $\times 10^5$ 細胞/ml となるように懸濁し、175cm<sup>2</sup>フラスコ(グライナー社製)に200mlずつ計5本に分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、5~7日間培養し、コンフルエントになった時点で各培養上清約1.1

～2.5Lを回収した。カラムに約1mlのプロセッパA（バイオプロセッシング社製）を充填し、10mlの1Mグリシン-0.15M NaCl（pH8.6）を用いて1ml/分の流速でカラムを洗浄した。洗浄後、上記のように調製した抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体生産株KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555を含む培養上清それぞれ2.3L、2.5L、1.9L、2.4L、1.1L、2Lを70ml/時の流速でプロセッパAカラムに通塔した。さらに10mlの1Mグリシン-0.15M NaCl（pH8.6）を用いて1ml/分の流速で洗浄した後、pH6、pH5、pH4の50mMクエン酸緩衝液各4mlで段階的に洗浄し、50mMクエン酸緩衝液（pH3.0）を7ml通塔してヒト型CDR移植抗体を溶出した。その結果、抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555がそれぞれ1.1mg、1.8mg、1.6mg、2.2mg、1.3mg、1.6mg得られた。

精製した抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555は、参考例1の2項（3）に示したSDS-PAGE法で解析した。還元および非還元条件下でレーンあたりのタンパク質量として2μgの抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555、参考例1の2項（4）で示した抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2550およびコントロールヒト型CDR移植抗体としてヒトIgG1タイプで、ガングリオシドGM2に反応し、ヒトVEGF受容体Flt-1には反応しないKM8969（特開平10-257893）をそれぞれ泳動し、クーマシーブリリアントブルーにて染色した。その結果を第43図に示した。ヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555は、非還元条件下では分子量約150キロダルトンにIgGのバンドが認められ、還元条件下では約50キロダルトンにH鎖のバンドが、約25キロダルトンにL鎖のバンドが認められた。この結果は、IgG型の抗体は、還元条件下では分子間ジスルフィド結合が切断され、それぞれ2本のH鎖およびL鎖に分解し、非還元条件下ではそれぞれ2本のH鎖およびL鎖より構成される分子量150キロダルトンの分子として存在することと一致し、ヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555は正しい構造の抗体分子であることが示された。

（3）抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植キメラ抗体のヒトVEGF受容体Flt-1に対する結合活性

精製抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555および抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2550

のヒトVEGF受容体Flt-1に対する結合活性を参考例1の2項(5)の手順に従い、確認した。

プレートにコートするFlt-1 7Nは2  $\mu$ g/mlに固定し、精製抗体濃度を1.23~900ng/mlまで変化させた(3倍希釈系列)。

その結果を第44図に示す。抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555および抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型キメラ抗体KM2550は抗体濃度依存的にヒトVEGF受容体Flt-1 7Nに結合した。また、抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555および抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2550の結合活性はほぼ同等であった。従って、本発明の6種のヒト型CDR移植抗体はヒト型キメラ抗体KM2550の有する結合活性を保持していることが明らかとなった。

次に、抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555および抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2550の結合特異性を検討するために、5種類の可溶性ヒトVEGF受容体誘導体タンパク質Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2N (W098/22616)、Flt-1 7N.K2 [参考例1の2(6-5)]、KDR 7N [参考例1の2(6-5)]に対する反応性を酵素免疫測定法を用いて検討した。96ウェルのEIA 用プレートに吸着させる可溶性ヒトVEGF受容体誘導体蛋白質の濃度は10  $\mu$ g/ml (3倍希釈系列)に、抗体濃度は5  $\mu$ g/mlに固定した。

その結果を第45図に示す。抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555および抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2550は全て同等の反応特異性を示し、Flt-1 7N、Flt-1 3N、Flt-1 2Nに反応し、Flt-1 7N.K2、KDR 7Nには全く反応しなかった。陰性コントロール抗体である抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8969 (特開平10-257893) はいずれの可溶性ヒトVEGF受容体誘導体蛋白質にも反応しなかった。従って、本発明の6種のヒト型CDR移植抗体はヒト型キメラ抗体KM2550の有する結合特異性を保持していることが明らかとなった。

次に、抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555および抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2550によるヒトVEGFとヒトVEGF受容体Flt-1の結合阻害活性を参考例1の2項(5)に記載した方法に従い検討した。添加する抗体濃度は0.0048~15  $\mu$ g/ml (5倍希

釈系列)とした。その結果を第46図に示す。第46図に示したように抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型CDR移植抗体KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554、KM8555および抗ヒトVEGF受容体Flt-1ヒト型キメラ抗体KM2550は抗体濃度依存的にヒトVEGFとヒトVEGF受容体Flt-1の結合を阻害した。また、従って、本発明で確立した6種のヒト型CDR移植抗体はヒト型キメラ抗体KM2550の有するVEGF-Flt-1結合阻害活性を保持していることが明らかとなった。

#### 産業上の利用可能性

本発明は、抗Flt-1抗体等を用いる単球、マクロファージの検出方法、および該抗体を用いる単球、マクロファージが関与する疾患の治療および診断に関する。

## 請求の範囲

1. ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質を有効成分として含有する、造血幹細胞から単球・マクロファージへの分化を検出する試薬。
2. ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質が、ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体である請求項1記載の試薬。
3. ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である請求項2記載の試薬。
4. モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト化抗体、またはそれらの抗体断片から選ばれる抗体である請求項3記載の試薬。
5. ハイブリドーマが産生する抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748およびKM1750からなる群より選ばれる抗体である請求項4記載の試薬。
6. ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域移植抗体から選ばれる抗体である請求項4記載の試薬。
7. ヒト型キメラ抗体が、KM2532またはKM2550である請求項6記載の試薬。
8. ヒト型相補性決定領域抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554およびKM8555からなる群より選ばれる抗体である請求項6記載の試薬。
9. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化Fvおよび相補性決定領域を含むペプチドからなる群より選ばれる抗体断片である請求項4記載の試薬。
10. 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である請求項2～9いずれか1項に記載の試薬。
11. ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質を用いて、造血幹細胞から単球・マクロファージへの分化を検出する方法。
12. ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質が、ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体である請求項11記載の方法。
13. ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である請求項12記載の方法。
14. モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト化抗体、またはそれらの抗体断片から選ばれる抗体である請求項13記載の方法。
15. ハイブリドーマが産生する抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748およびKM1750からなる群より選ばれる抗体である請求項14記載の方法。

16. ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域移植抗体から選ばれる抗体である請求項 1 4 記載の方法。

17. ヒト型キメラ抗体が、KM2532またはKM2550である請求項 1 6 記載の方法。

18. ヒト型相補性移植移植抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554およびKM8555からなる群より選ばれる抗体である請求項 1 6 記載の方法。

19. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化Fvおよび相補性決定領域を含むペプチドからなる群より選ばれる抗体断片である請求項 1 4 記載の方法。

20. 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である請求項 1 2～1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

21. ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質を有効成分として含有する単球・マクロファージが関与する疾患の診断薬。

22. 単球・マクロファージが関与する疾患が、炎症性疾患、遅延型過敏症、動脈硬化または悪性腫瘍である請求項 2 1 記載の診断薬。

23. ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質が、ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体である請求項 2 1 記載の診断薬。

24. ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である請求項 2 3 記載の診断薬。

25. モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト化抗体、またはそれらの抗体断片から選ばれる抗体である請求項 2 4 記載の診断薬。

26. ハイブリドーマが産生する抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748およびKM1750からなる群より選ばれる抗体である請求項 2 5 記載の診断薬。

27. ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域移植抗体から選ばれる抗体である請求項 2 5 記載の診断薬。

28. ヒト型キメラ抗体が、KM2532またはKM2550である請求項 2 7 記載の診断薬。

29. ヒト型相補性決定領域移植抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554およびKM8555からなる群より選ばれる抗体である請求項 2 7 記載の診断薬。

30. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化Fvおよび相補性決定領域を含むペプチドからなる群から選ばれる抗体断片である請求項25記載の診断薬。

31. 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である請求項23～30のいずれか1項に記載の診断薬。

32. ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質を有効成分として含有する、単球・マクロファージが関与する疾患の診断方法。

33. 単球・マクロファージが関与する疾患が、炎症性疾患、遅延型過敏症、動脈硬化または悪性腫瘍である請求項32記載の診断方法。

34. ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合活性を有する物質がヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体である請求項32記載の診断方法。

35. ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である請求項34記載の診断方法。

36. モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト化抗体、またはそれらの抗体断片から選ばれる抗体である請求項35記載の診断方法。

37. ハイブリドーマが産生する抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748およびKM1750からなる群より選ばれる抗体である請求項36記載の診断方法。

38. ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域移植抗体から選ばれる抗体である請求項36記載の診断方法。

39. ヒト型キメラ抗体が、KM2532またはKM2550である請求項38記載の診断方法。

40. ヒト型相補性決定領域移植抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554およびKM8555からなる群より選ばれる抗体である請求項38記載の診断方法。

41. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化Fvおよび相補性決定領域を含むペプチドからなる群から選ばれる抗体断片である請求項36記載の診断方法。

42. 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である、請求項34～41のいずれか1項に記載の診断方法。

43. ヒトVEGF受容体Flt-1を介する情報伝達を阻害する物質を有効成分として含有する、単球・マクロファージの遊走阻害剤。

44. ヒトVEGF受容体Flt-1を介する情報伝達を阻害する物質がVEGFのFlt-1受容体への結合を阻害する物質、またはFlt-1受容体からの情報伝達を阻害する物質である請求項43記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

45. VEGFのFlt-1受容体への結合を阻害する物質が、ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体である請求項44記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

46. ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である請求項45記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

47. ヒトVEGF受容体Flt-1に対するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト化抗体、またはそれらの抗体断片から選ばれる抗体である、請求項46記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

48. ハイブリドーマが産生する抗体が、KM1732、KM1748およびKM1750から選ばれる抗体である請求項47記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

49. ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域移植抗体から選ばれる抗体である請求項47記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

50. ヒト型キメラ抗体が、KM2532またはKM2550である請求項49記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

51. ヒト型相補性決定領域移植抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554およびKM8555からなる群より選ばれる抗体である請求項49記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

52. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化Fvおよび相補性決定領域を含むペプチドからなる群より選ばれる抗体である請求項47記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

53. 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である請求項45～52のいずれか1項に記載の単球・マクロファージの遊走阻害剤。

54. ヒトVEGF受容体Flt-1を介する情報伝達を阻害する物質を有効成分として含有する単球・マクロファージが関与する疾患の治療薬。

55. 単球・マクロファージが関与する疾患が、炎症性疾患、遅延型過敏症、動脈硬化または悪性腫瘍である請求項54記載の治療薬。



56. ヒトVEGF受容体Flt-1を介する情報伝達を阻害する物質がVEGFのFlt-1受容体への結合を阻害する物質、またはFlt-1受容体からの情報伝達を阻害する物質である請求項55記載の治療薬。

57. VEGFのFlt-1受容体への結合を阻害する物質が、ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体である請求項56記載の治療薬。

58. ヒトVEGF受容体Flt-1に対する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である請求項57記載の治療薬。

59. ヒトVEGF受容体Flt-1に対するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体およびヒト化抗体、またはそれらの抗体断片から選ばれる抗体である、請求項58記載の治療薬。

60. ハイブリドーマが産生する抗体が、KM1732、KM1748およびKM1750から選ばれる抗体である請求項59記載の治療薬。

61. ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域移植抗体から選ばれる抗体である請求項59記載の治療薬。

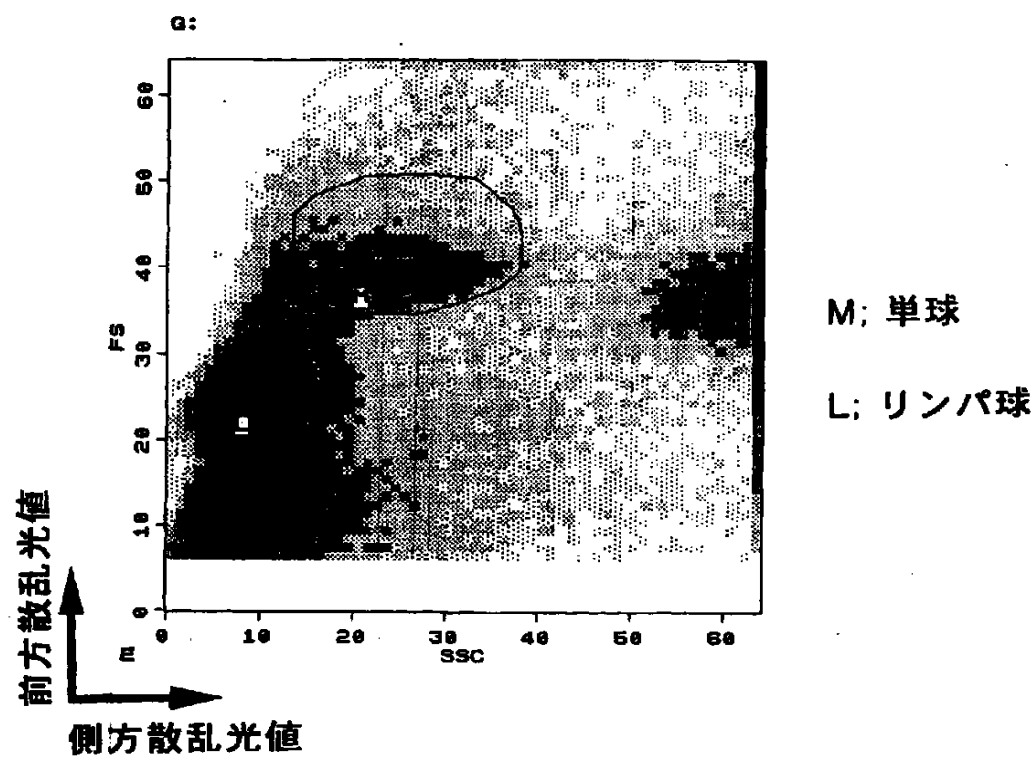
62. ヒト型キメラ抗体が、KM2532またはKM2550である請求項61記載の治療薬。

63. ヒト型相補性決定領域移植抗体が、KM8550、KM8551、KM8552、KM8553、KM8554およびKM8555からなる群より選ばれる抗体である請求項61記載の治療薬。

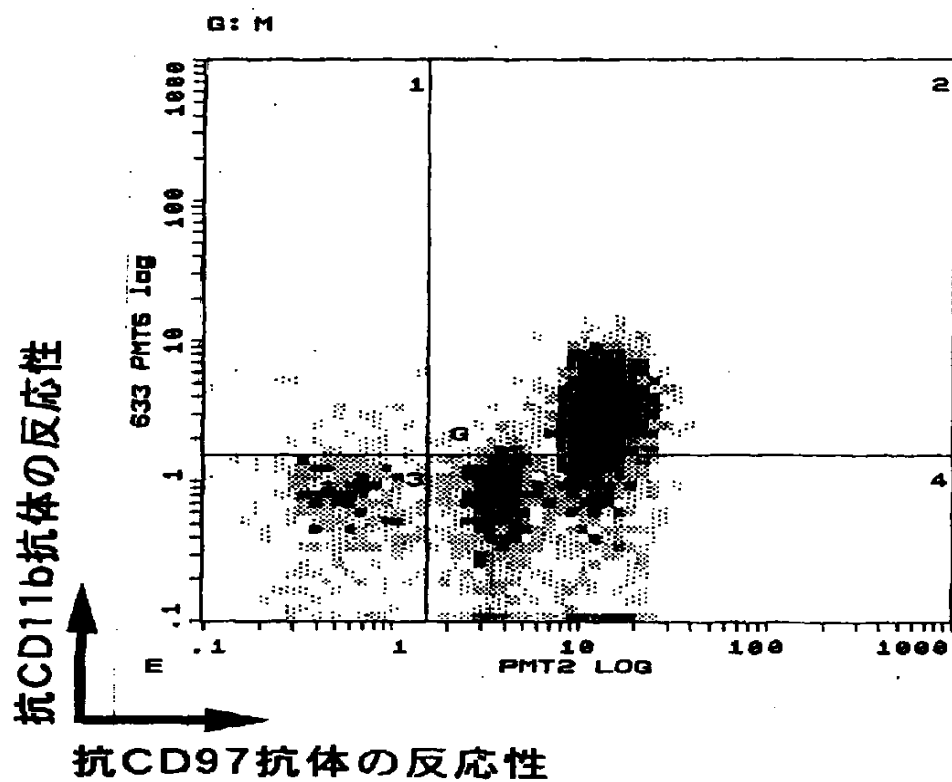
64. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化Fvおよび相補性決定領域を含むペプチドからなる群より選ばれる抗体である請求項59記載の治療薬。

65. 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である請求項57~64のいずれか1項に記載の治療薬。

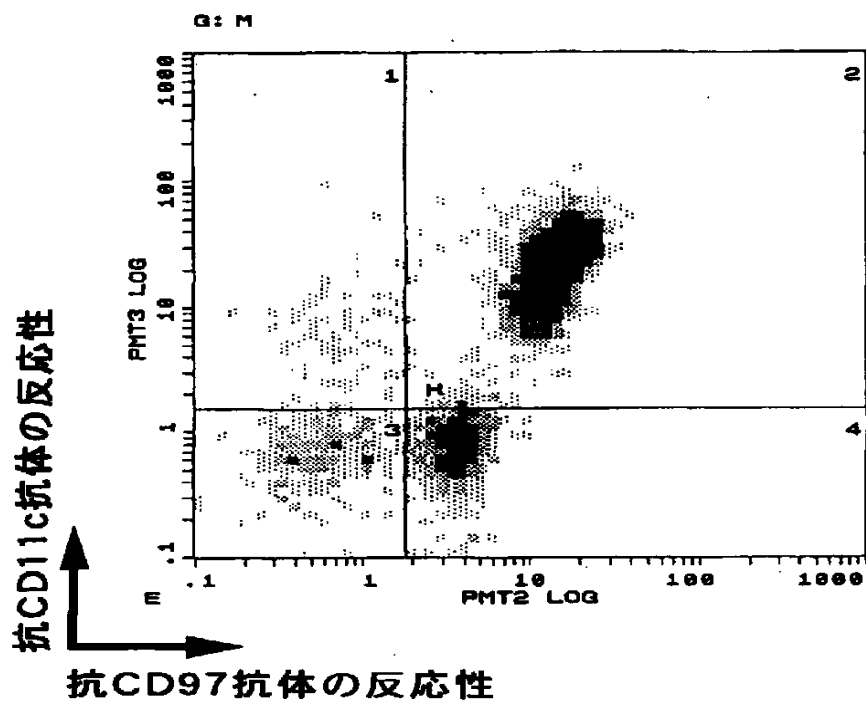
## 第 1 図



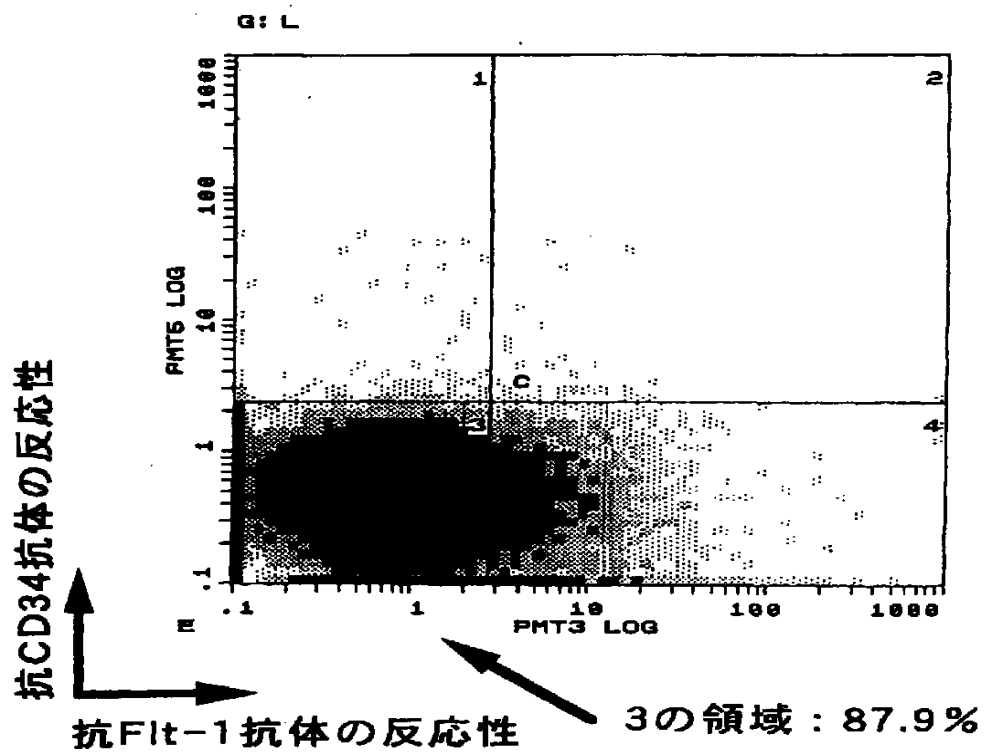
## 第 2 図



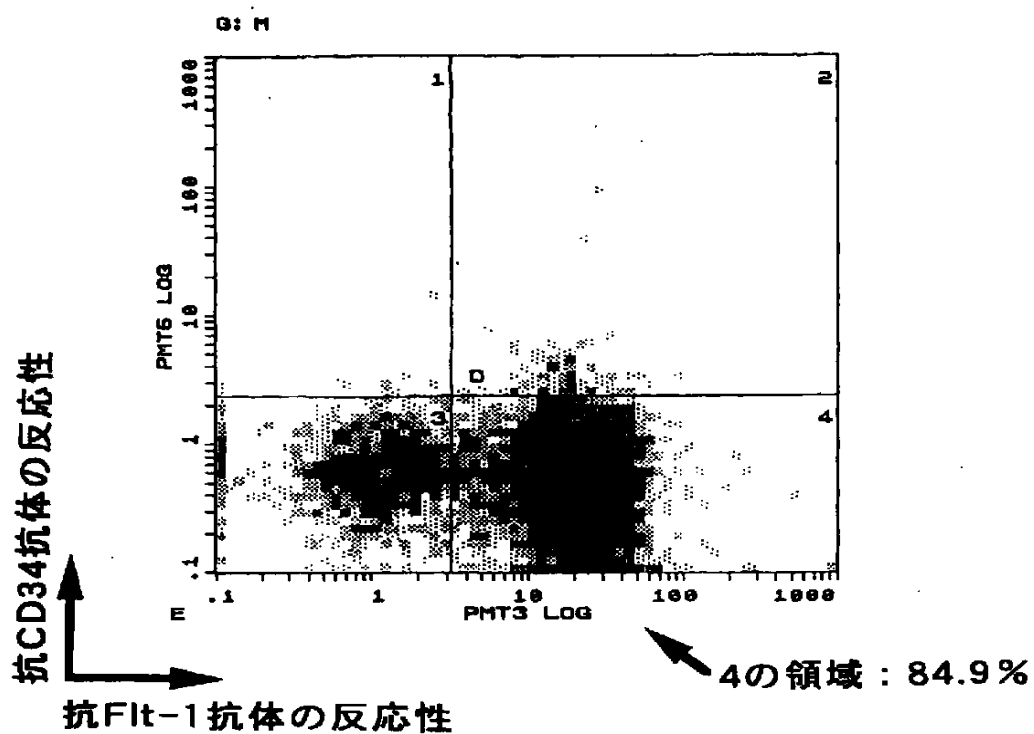
## 第 3 図



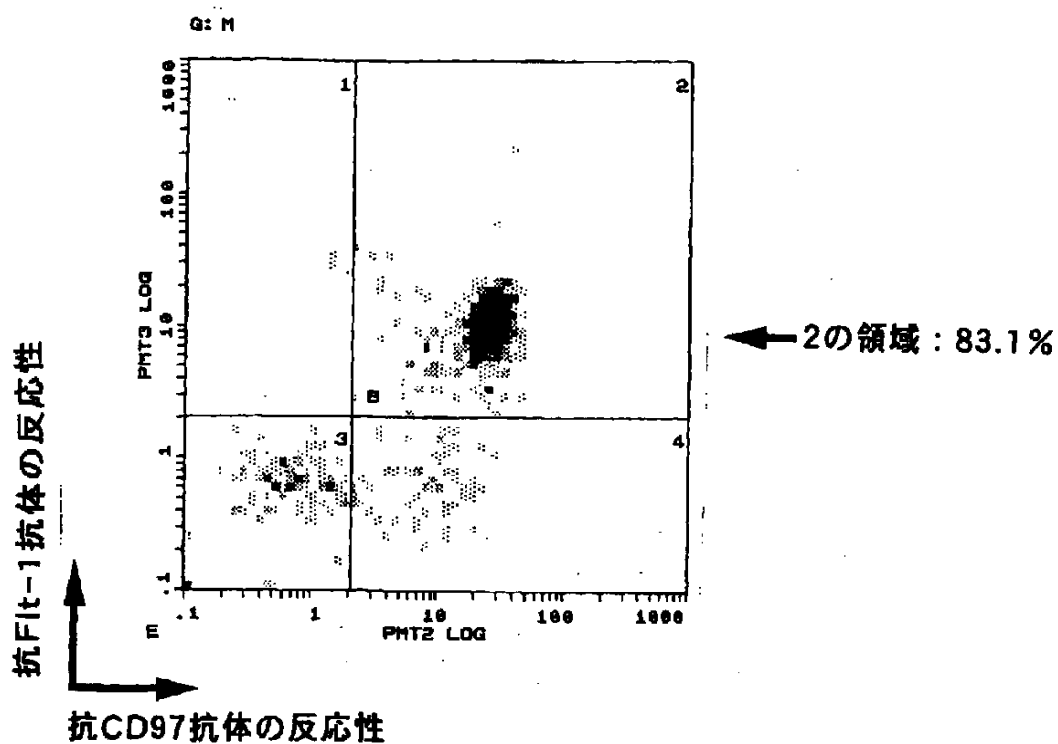
## 第 4 図



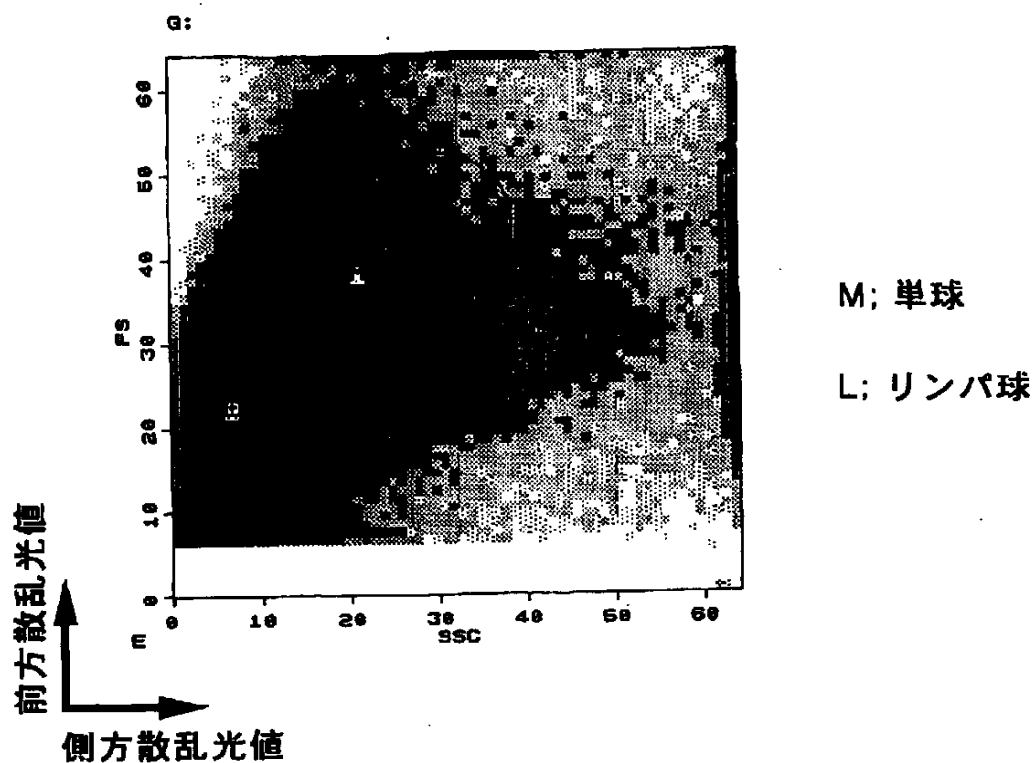
第 5 図



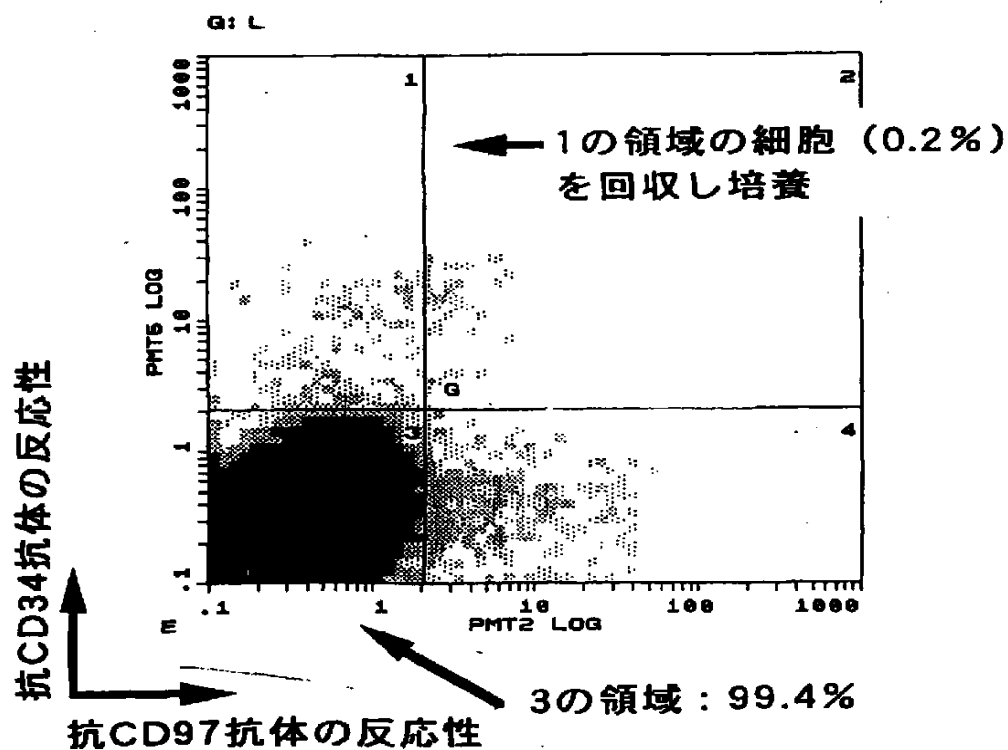
第 6 図



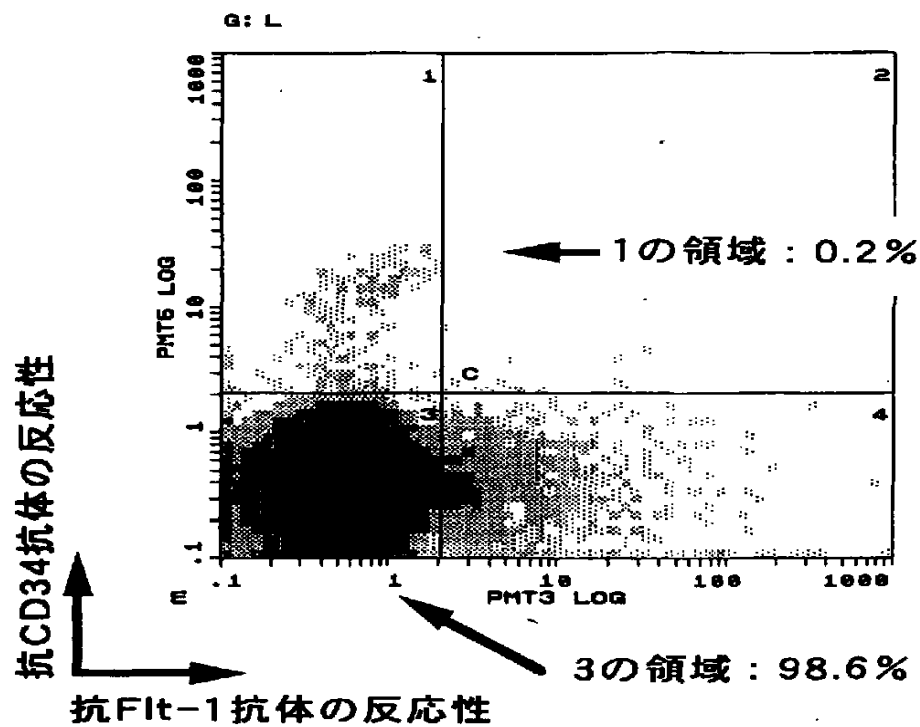
# 第 7 図



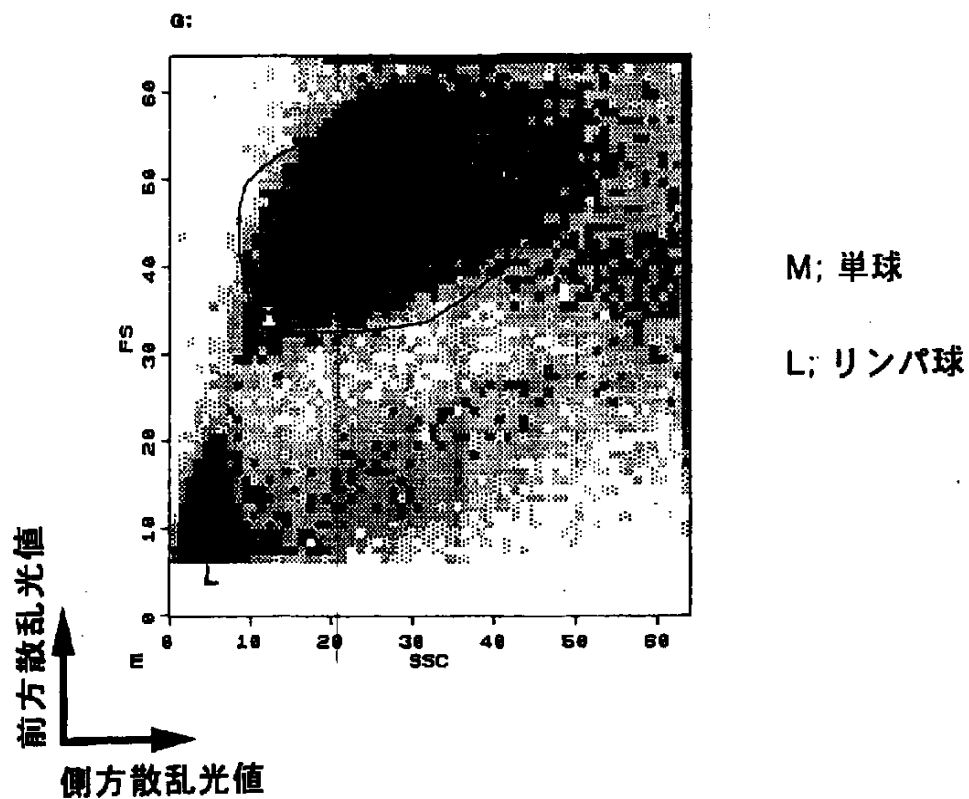
# 第 8 図



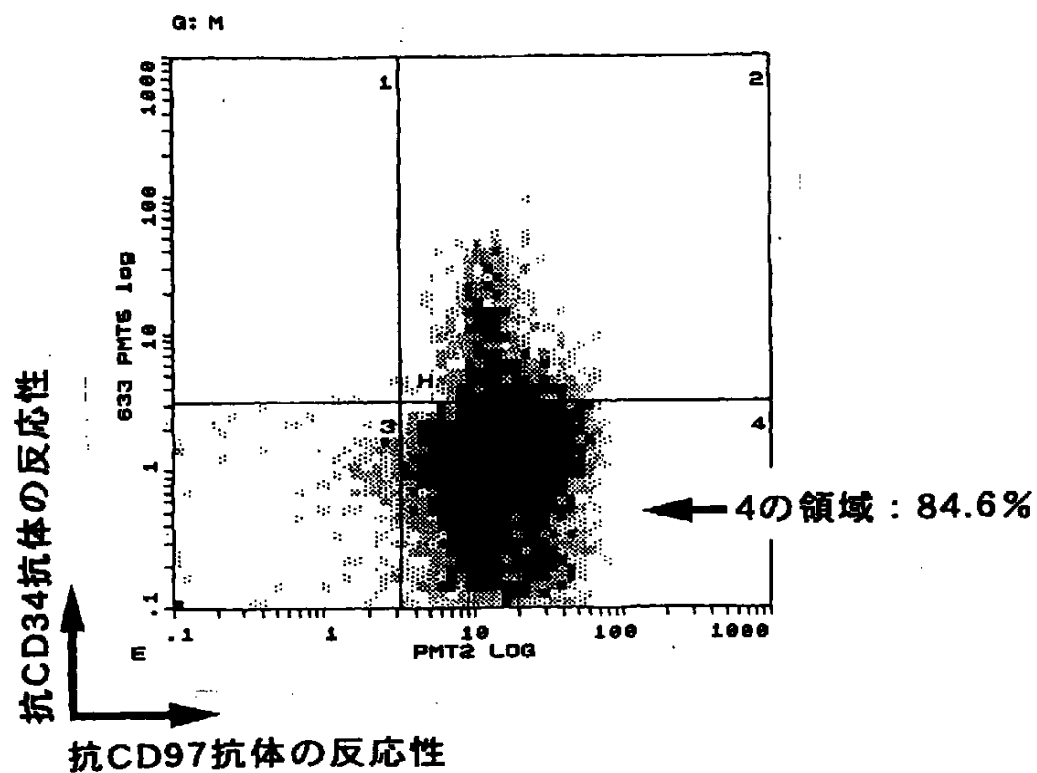
## 第 9 図



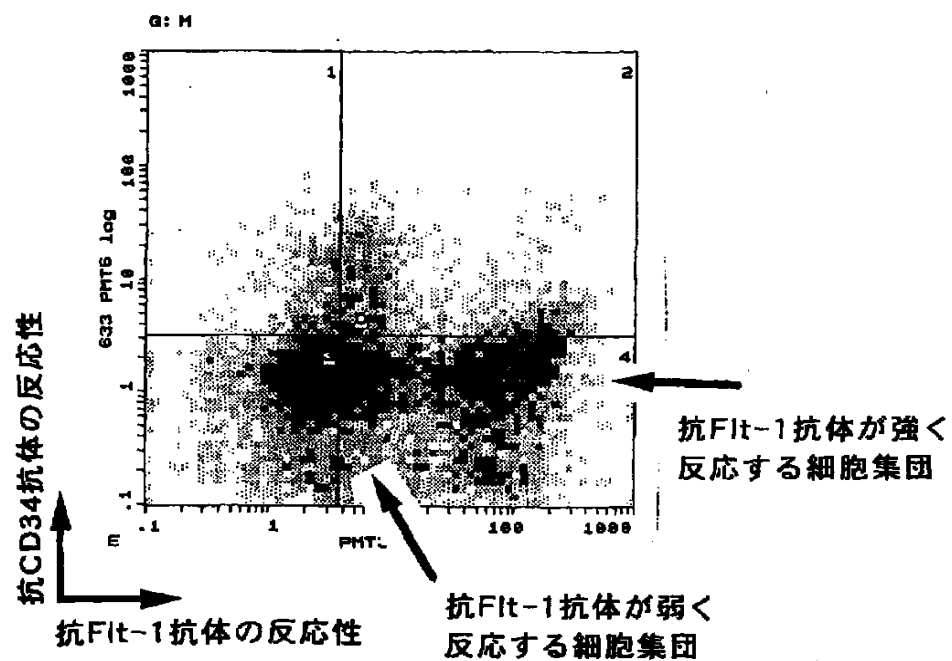
## 第 10 図



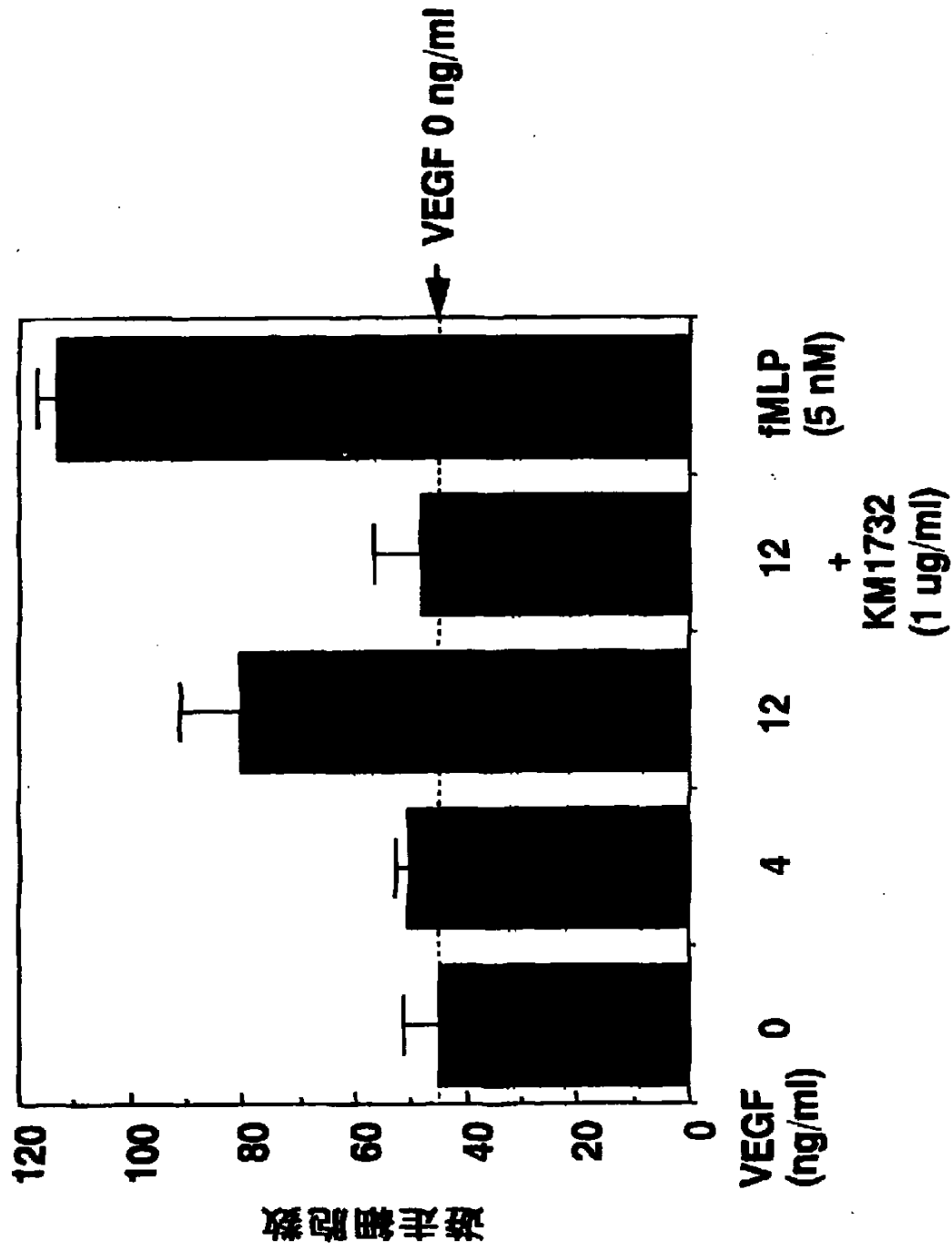
## 第 11 図



## 第 12 図

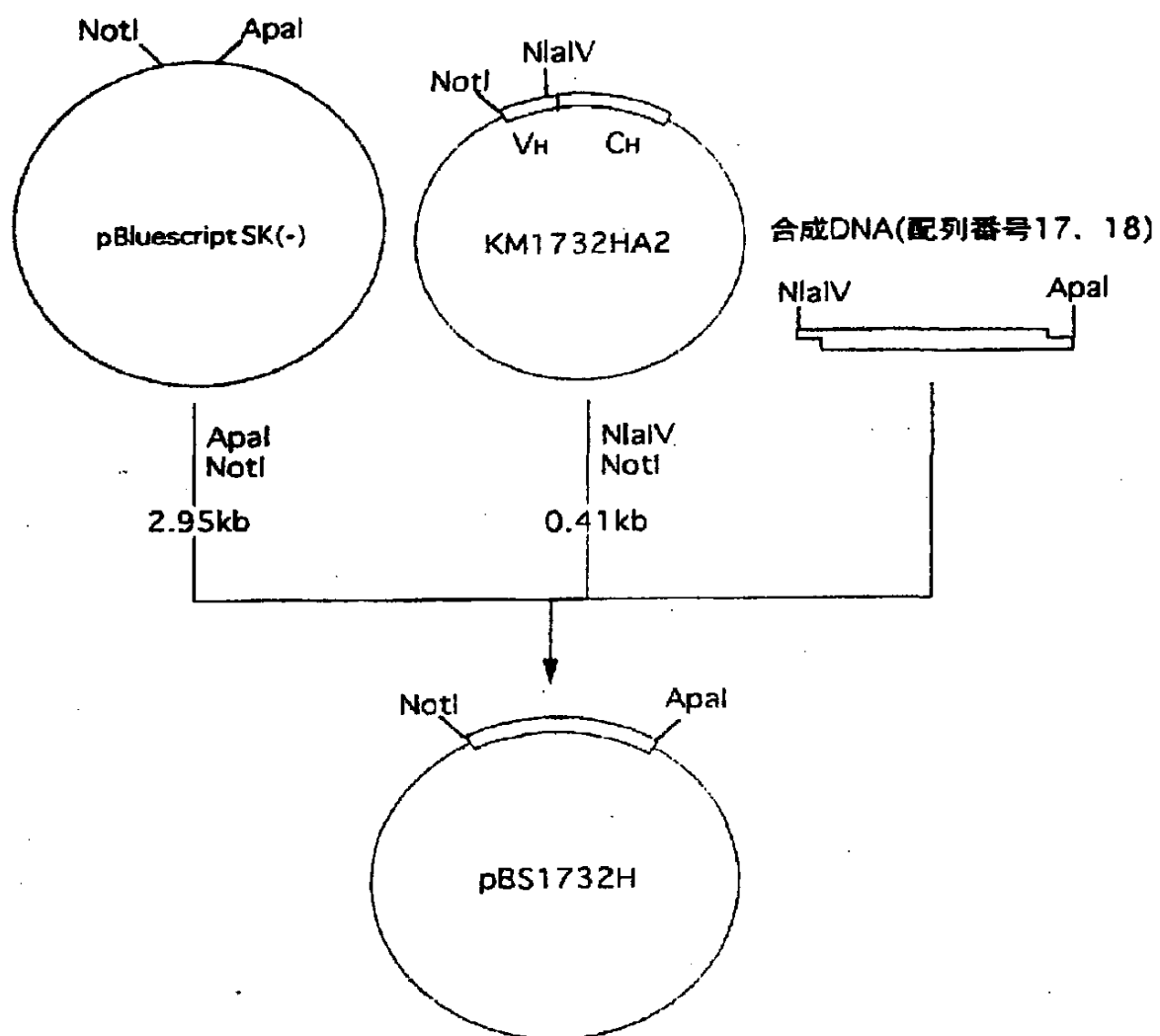


第 13 図

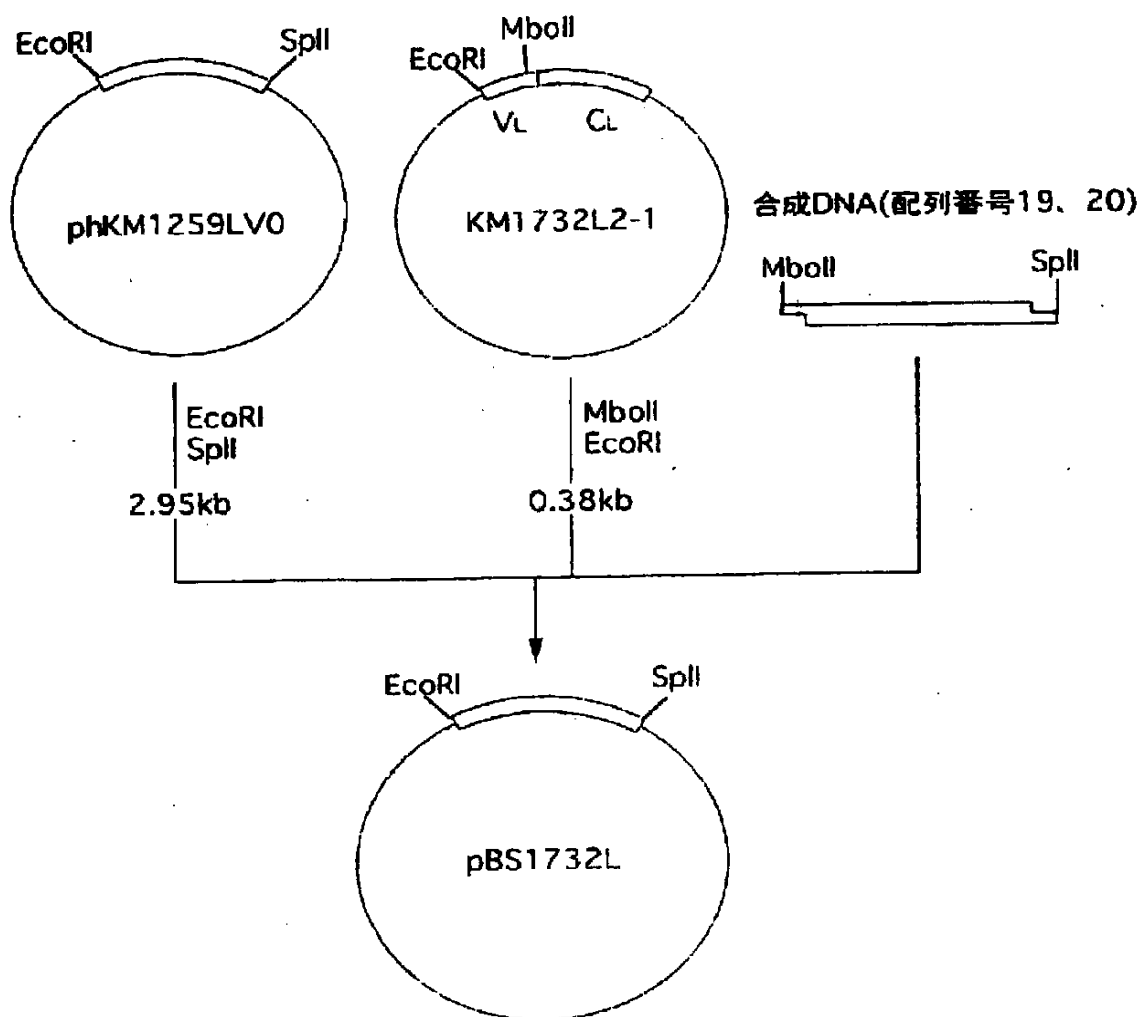




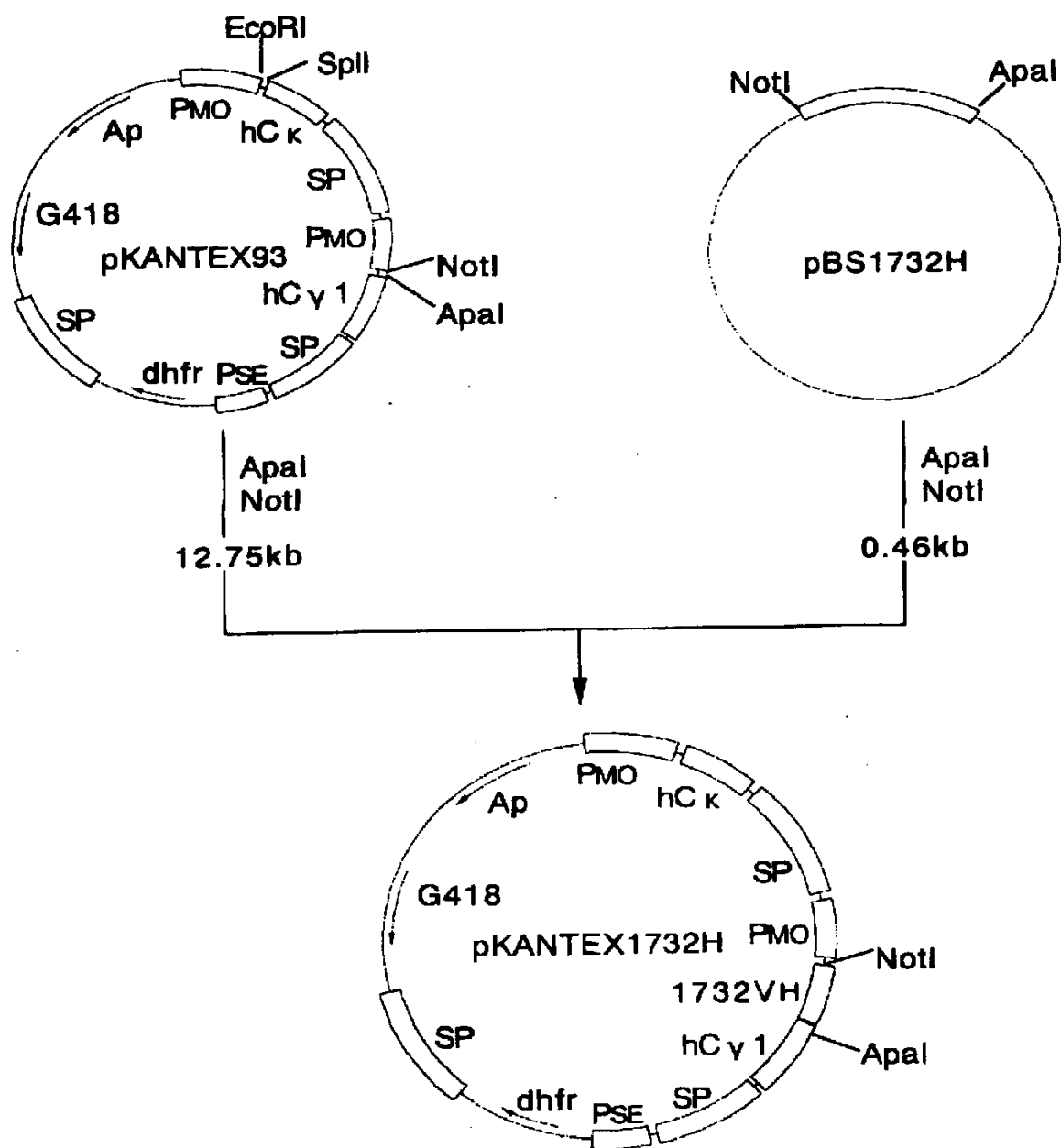
## 第 14 図



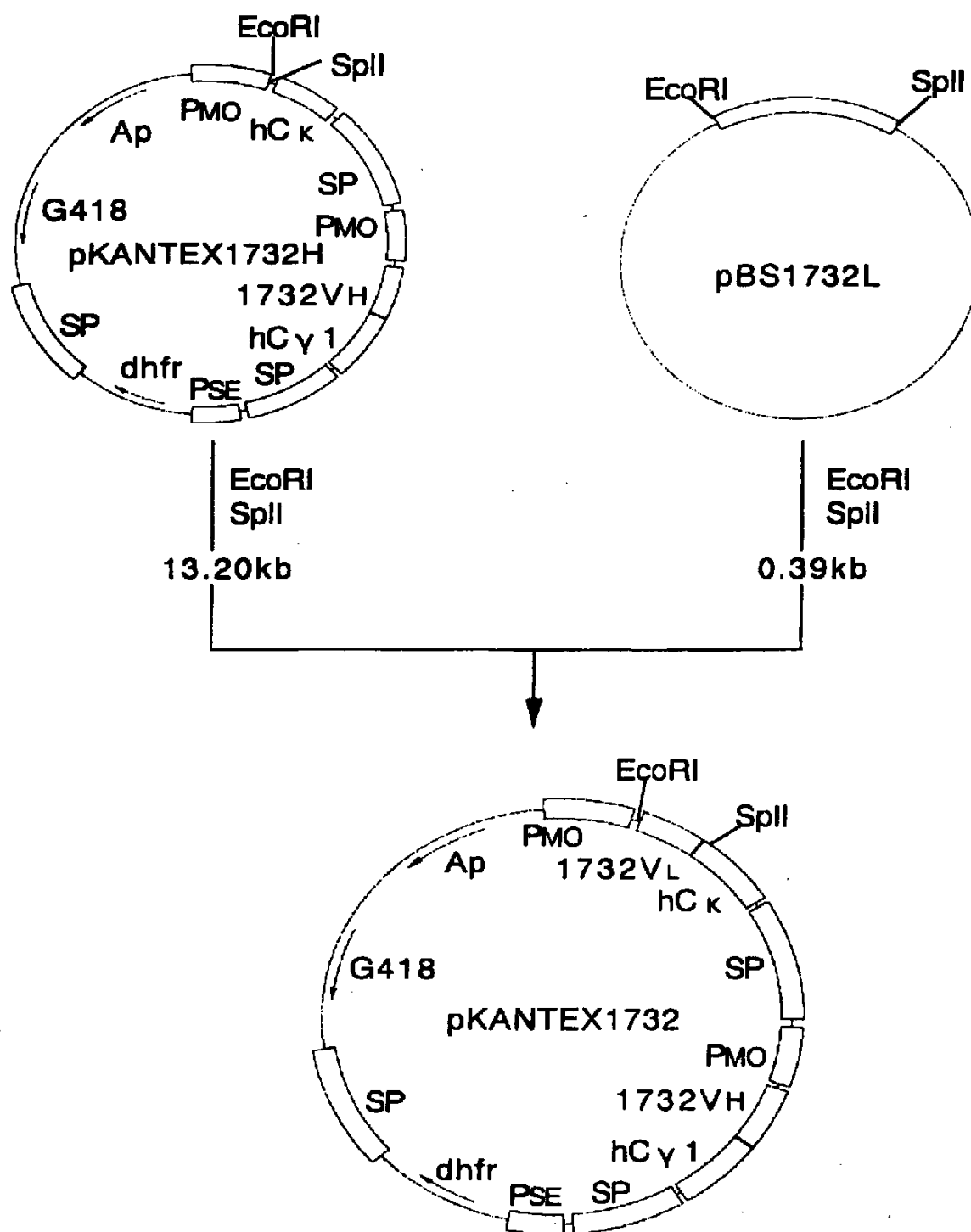
## 第 15 図



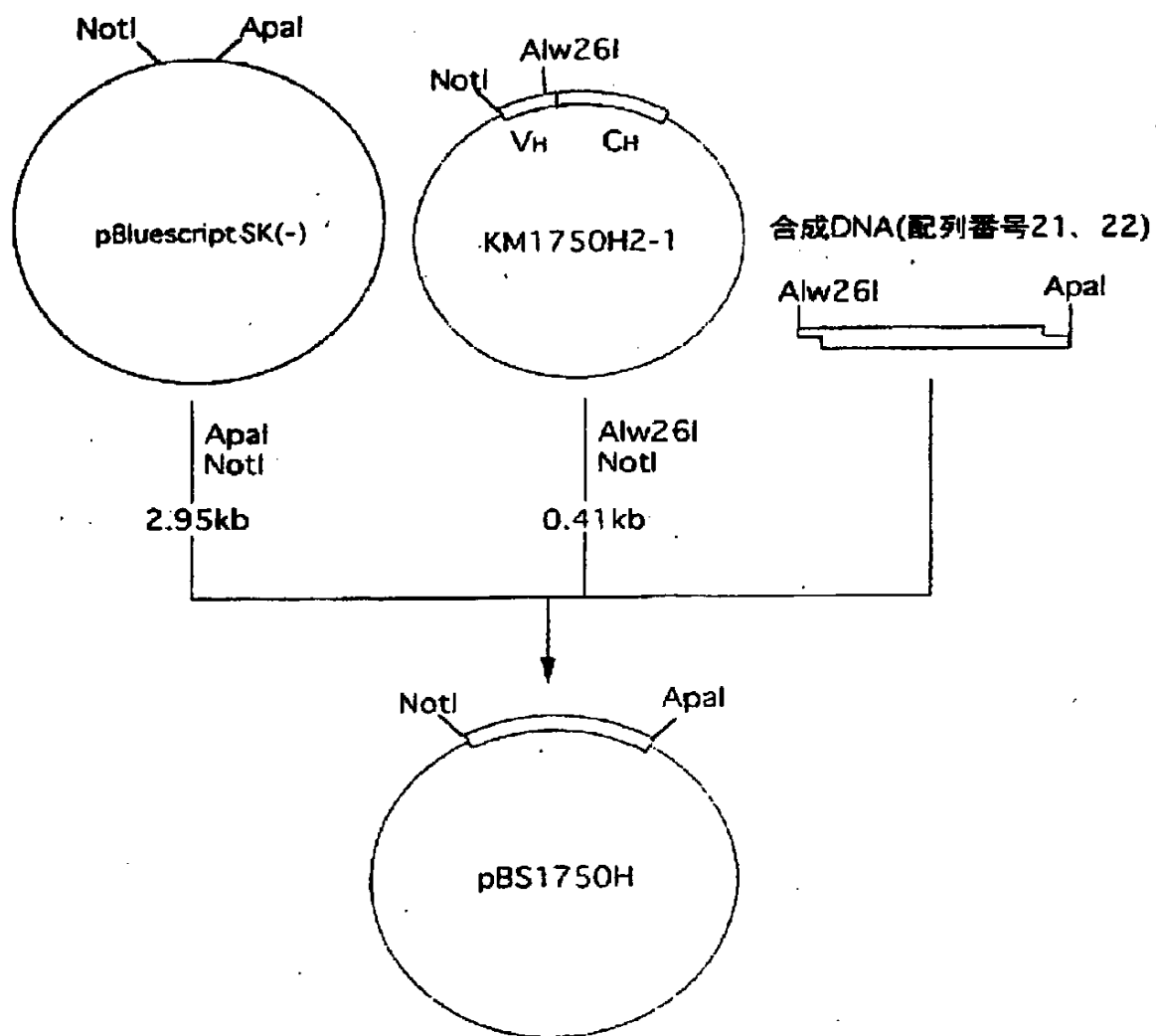
## 第 16 図



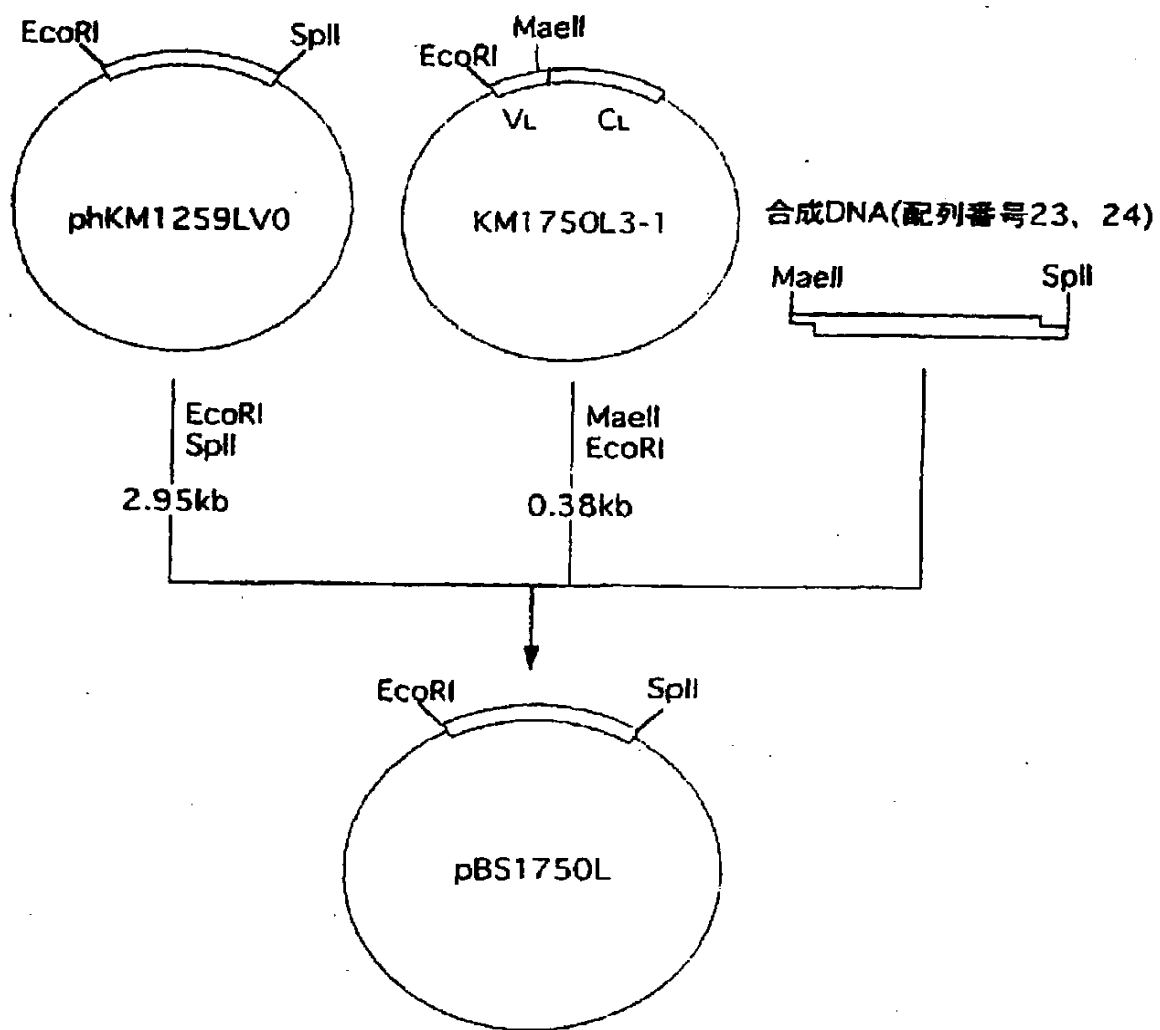
## 第 17 図



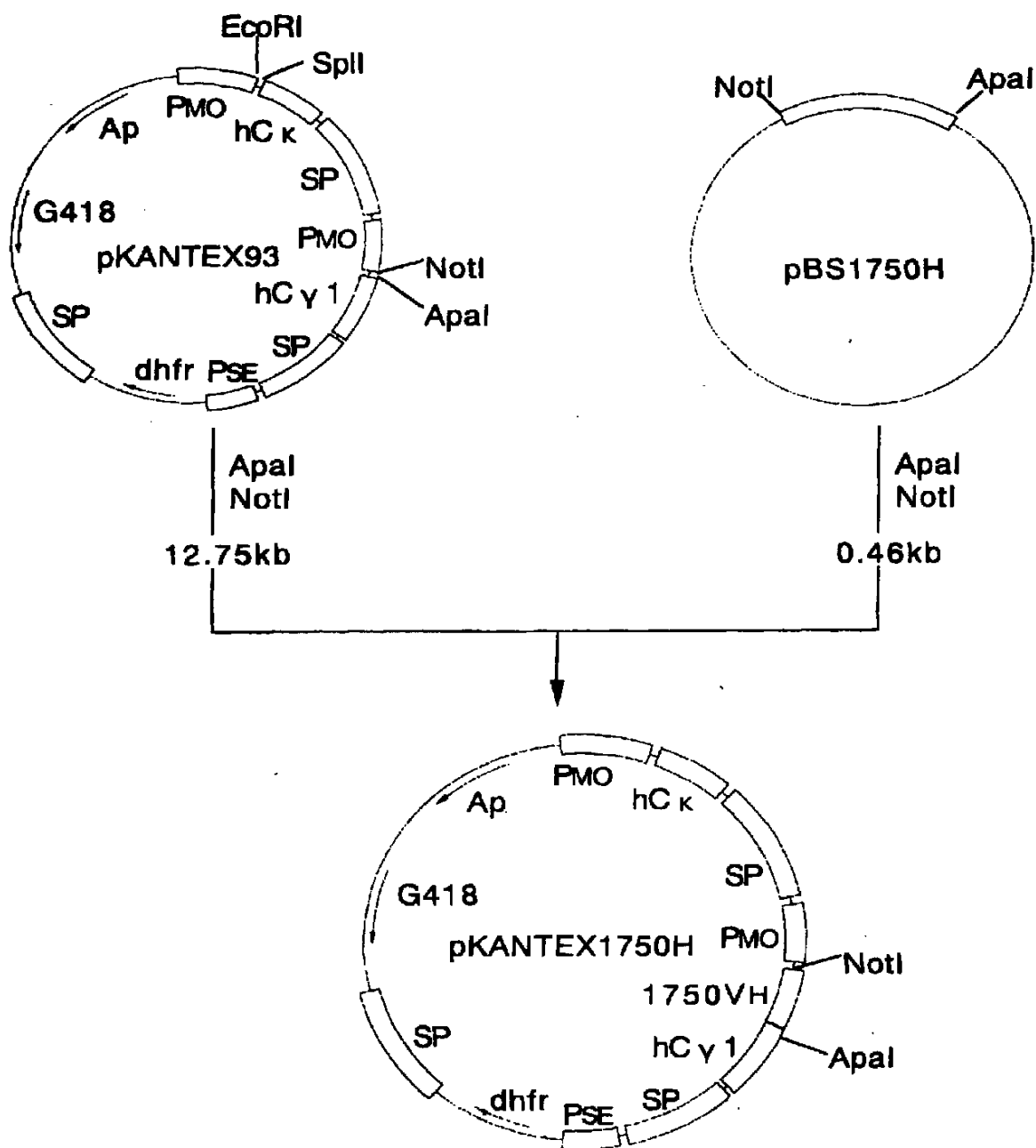
## 第 18 図



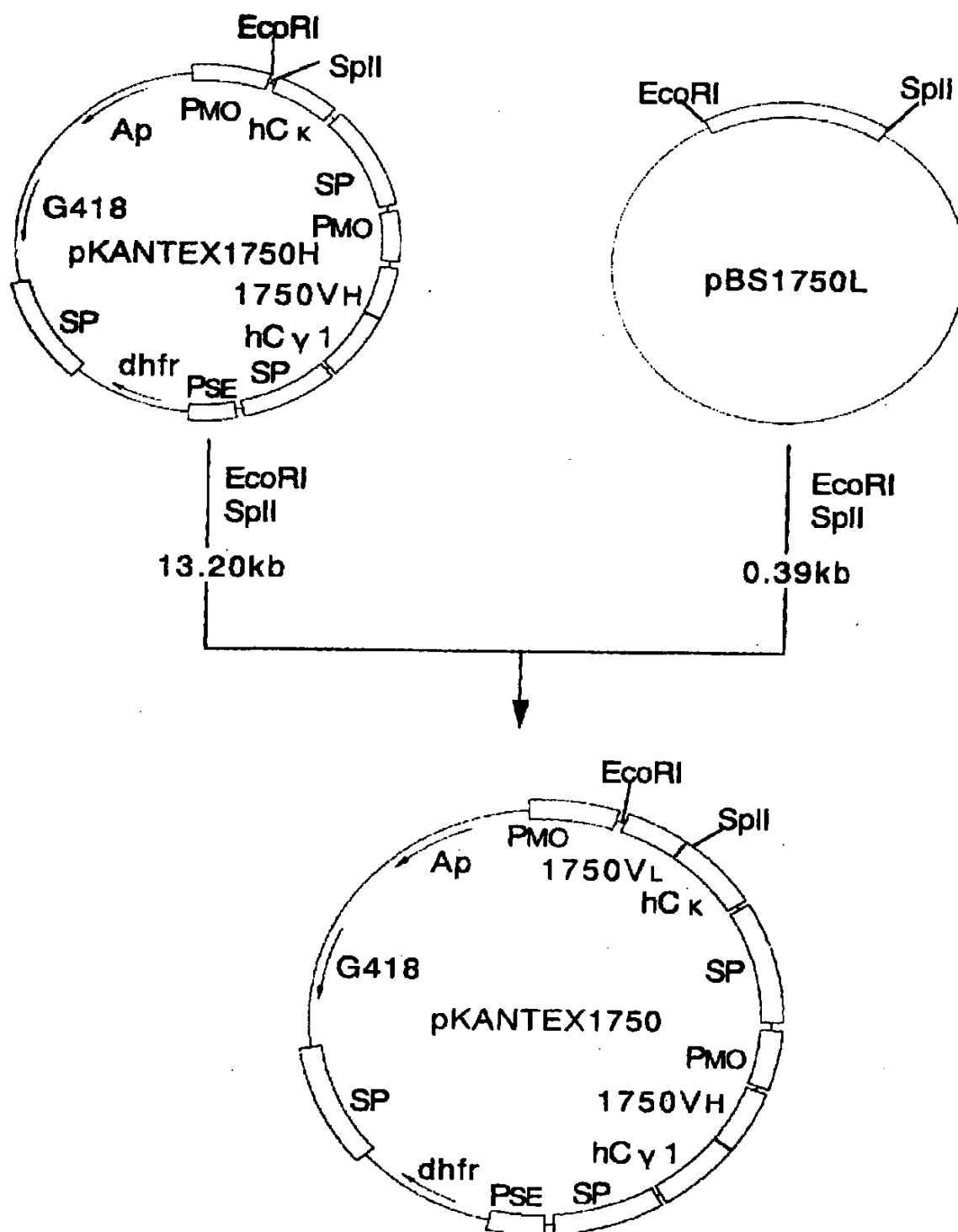
## 第 19 図



## 第 20 図

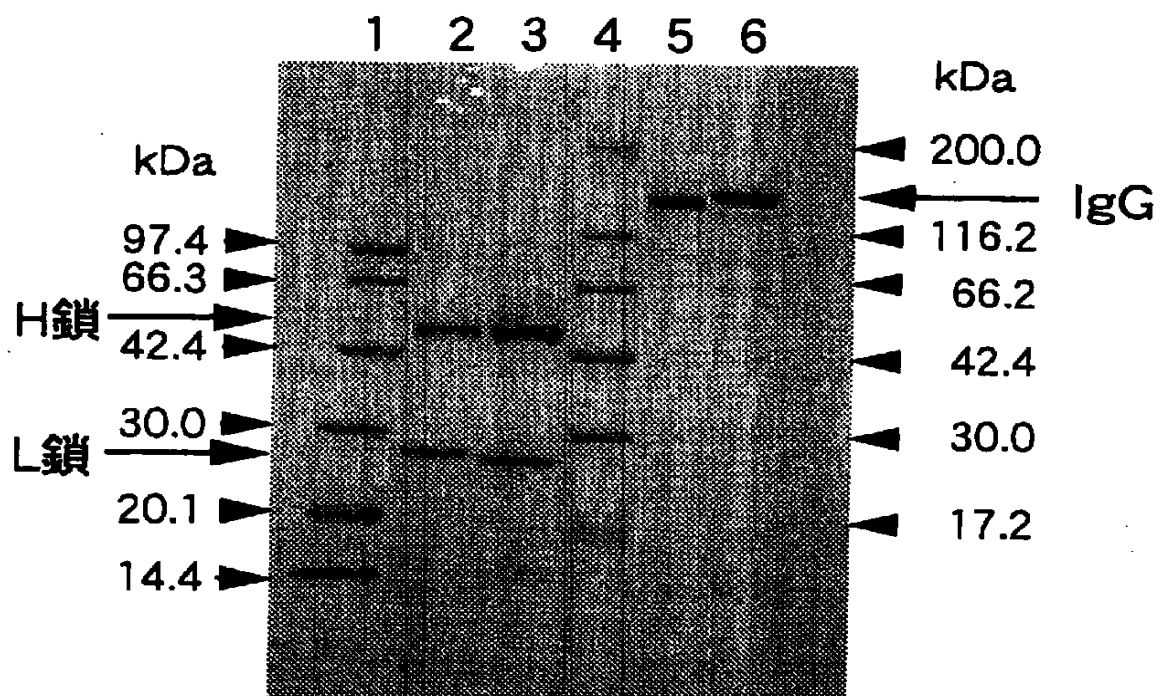


## 第 21 図





## 第 22 図



Lane 1 : 分子量マーカー、低分子

2 : KM2532 (還元条件)

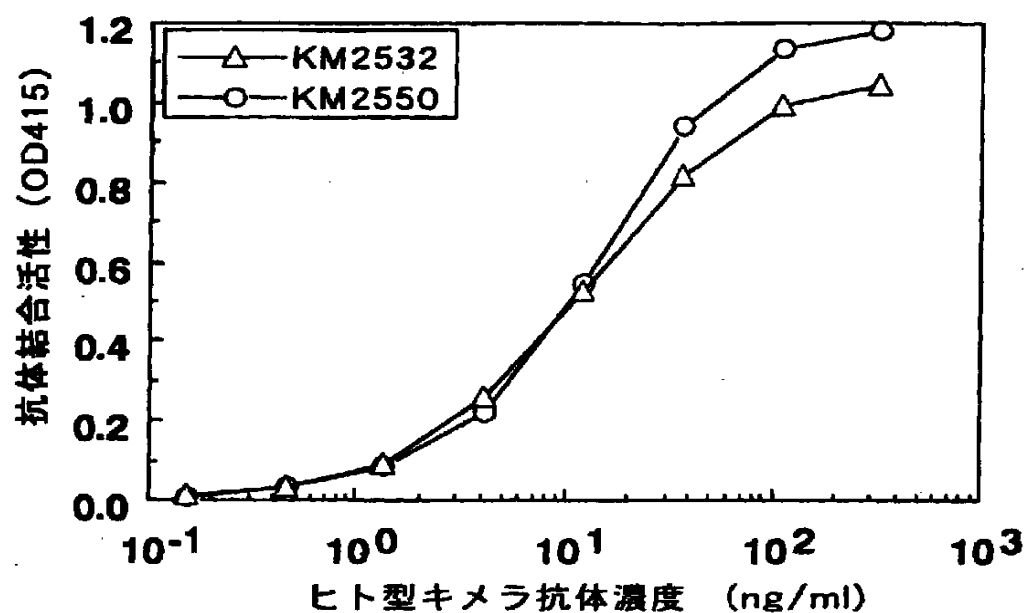
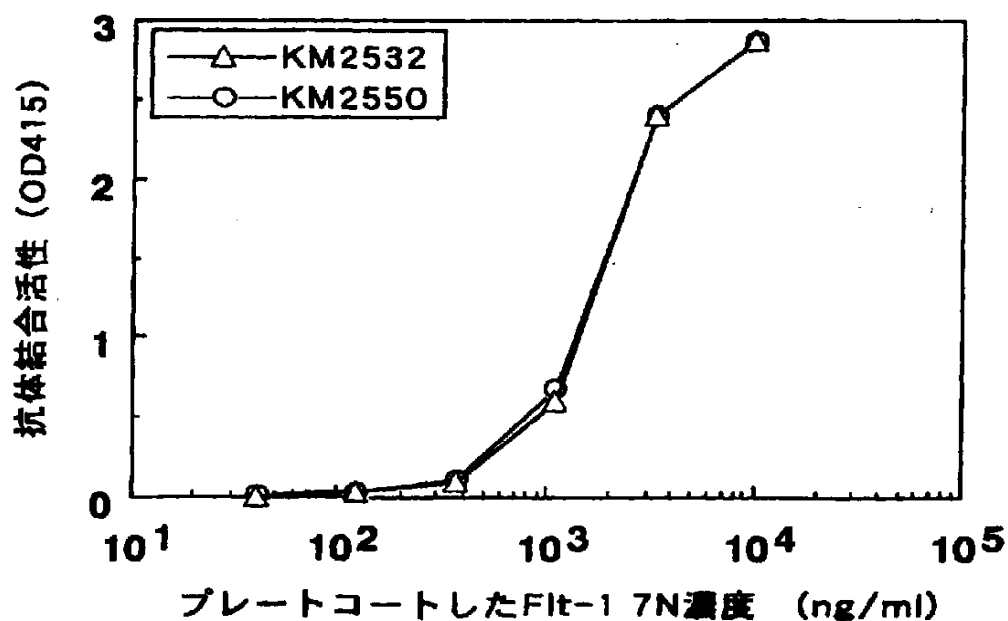
3 : KM2550 (還元条件)

4 : 分子量マーカー、高分子

5 : KM2532 (非還元条件)

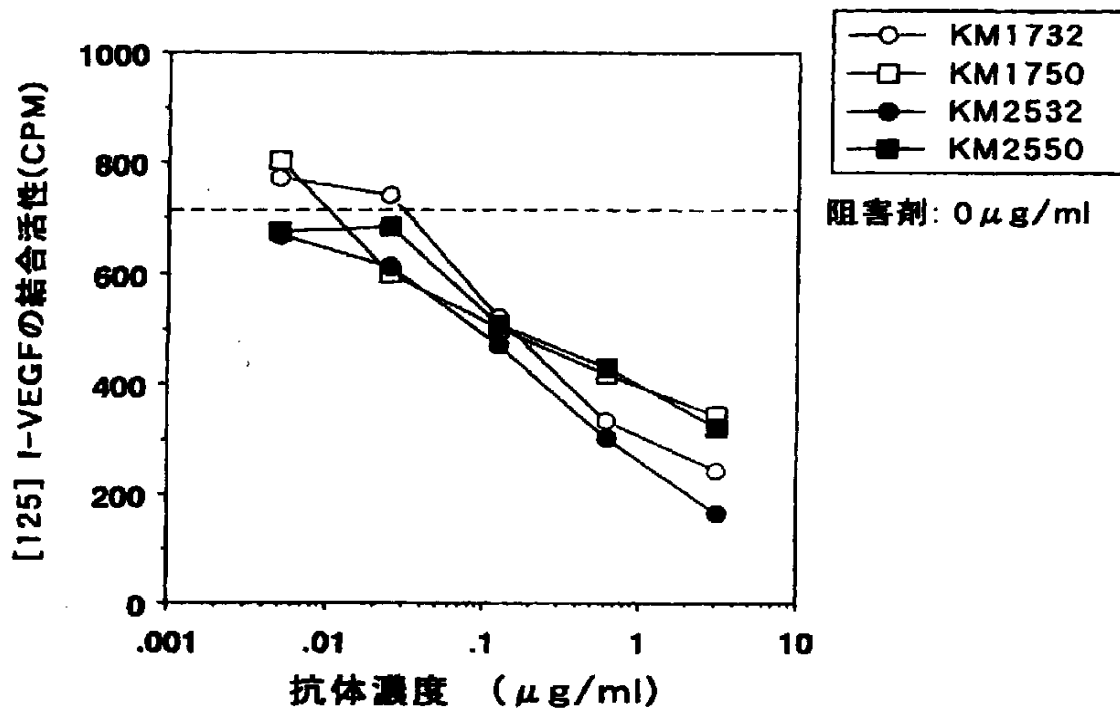
6 : KM2550 (非還元条件)

## 第 23 図

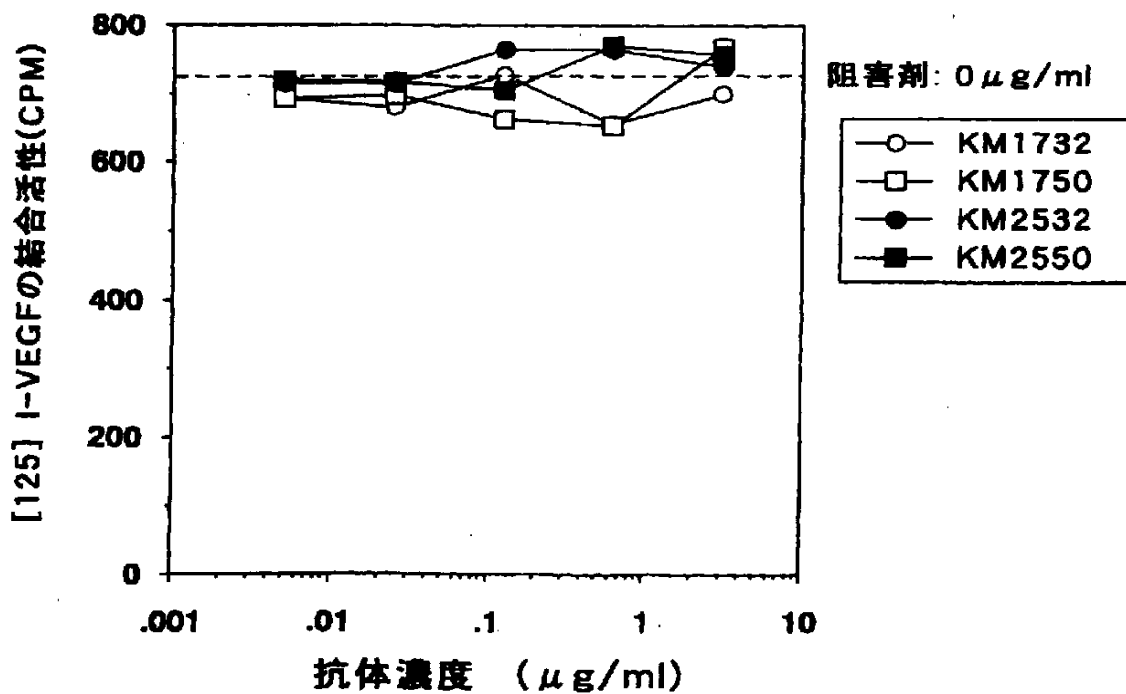
(A) プレートコートしたFlt-1 7N濃度:  $1 \mu\text{g/ml}$ (B) 添加したヒト型キメラ抗体濃度:  $10 \mu\text{g/ml}$ 

## 第 24 図

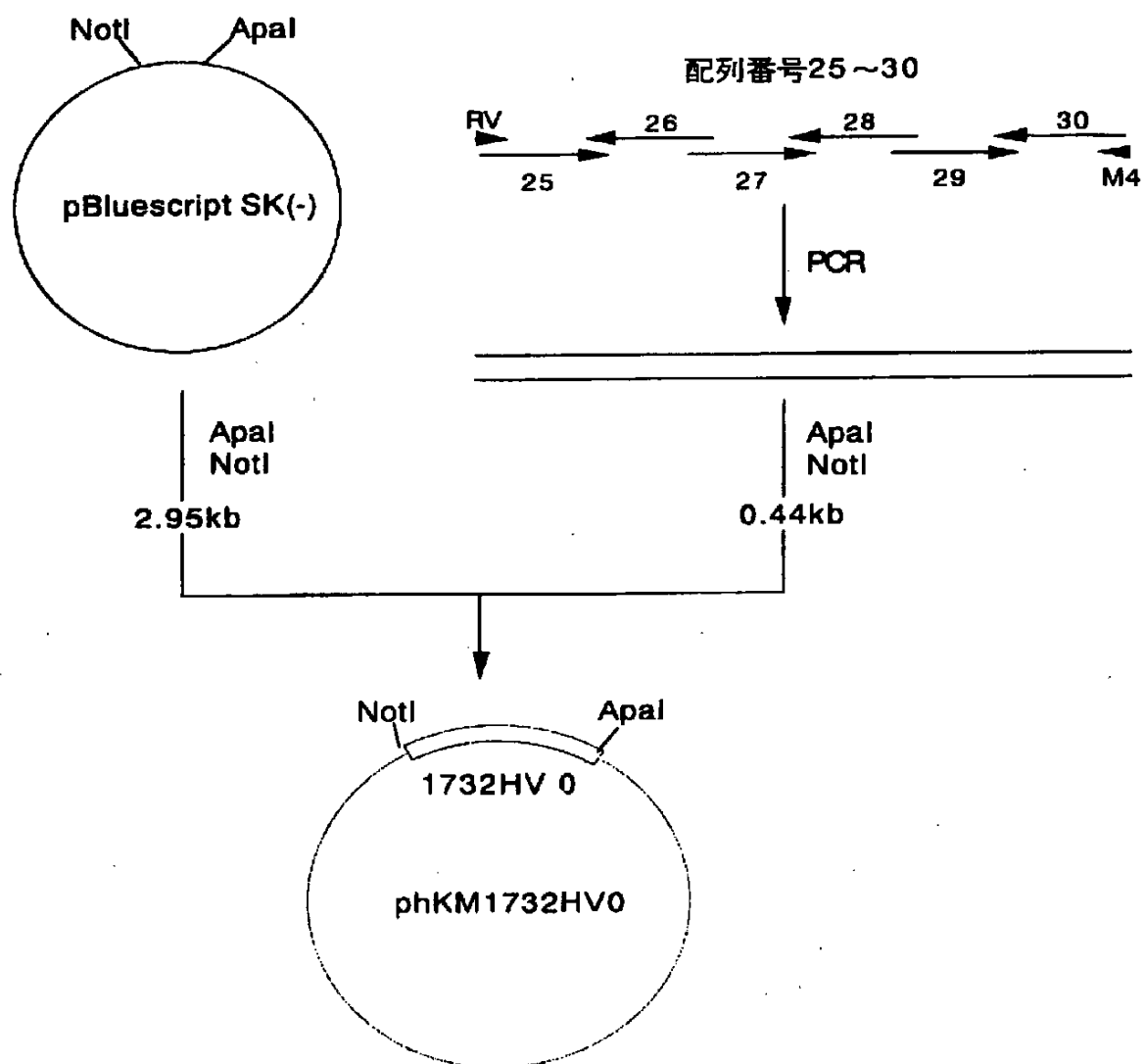
## (A) VEGF-可溶性Flt-1結合実験系



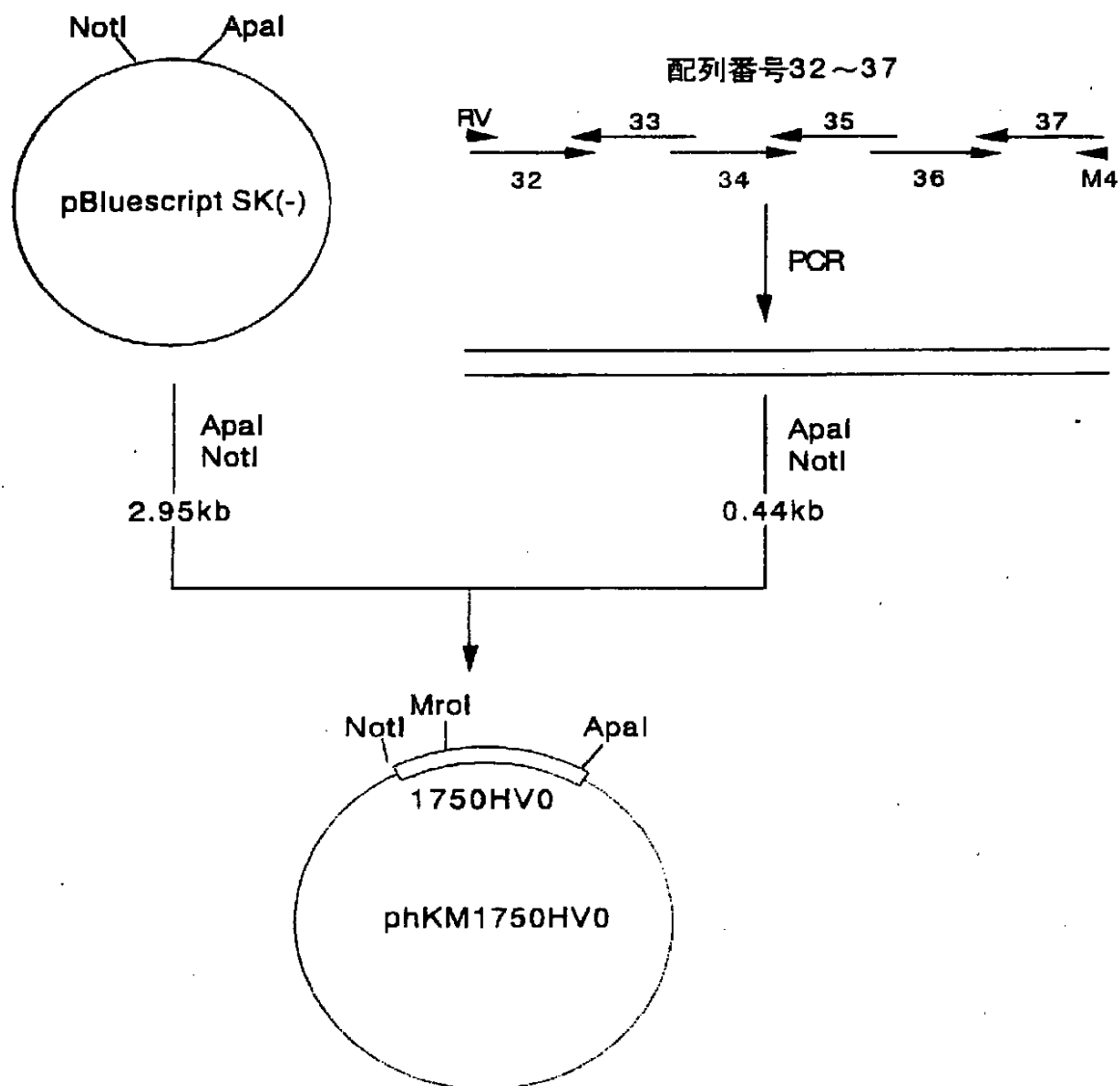
## (B) VEGF-可溶性KDR結合実験系



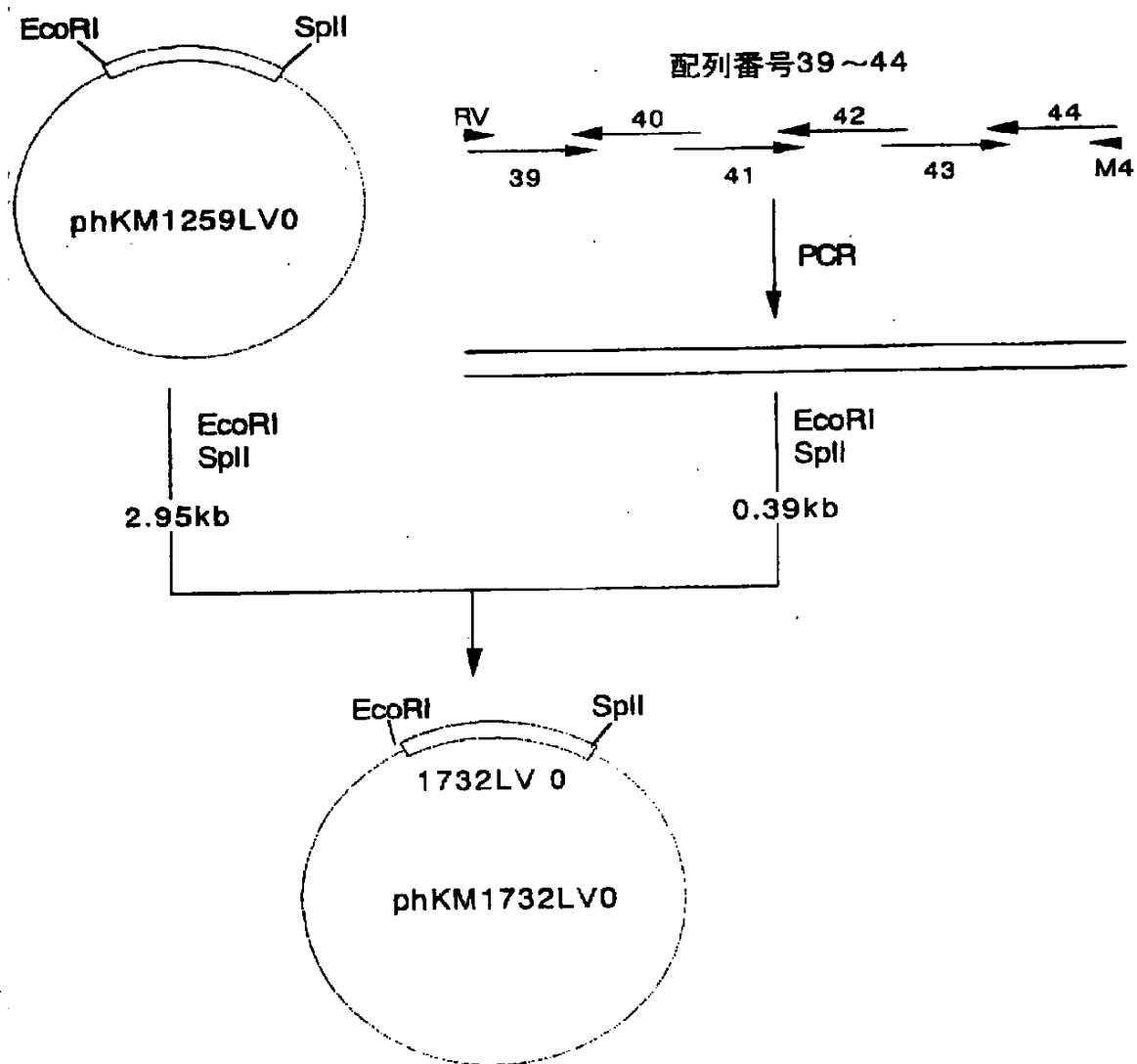
## 第 25 図



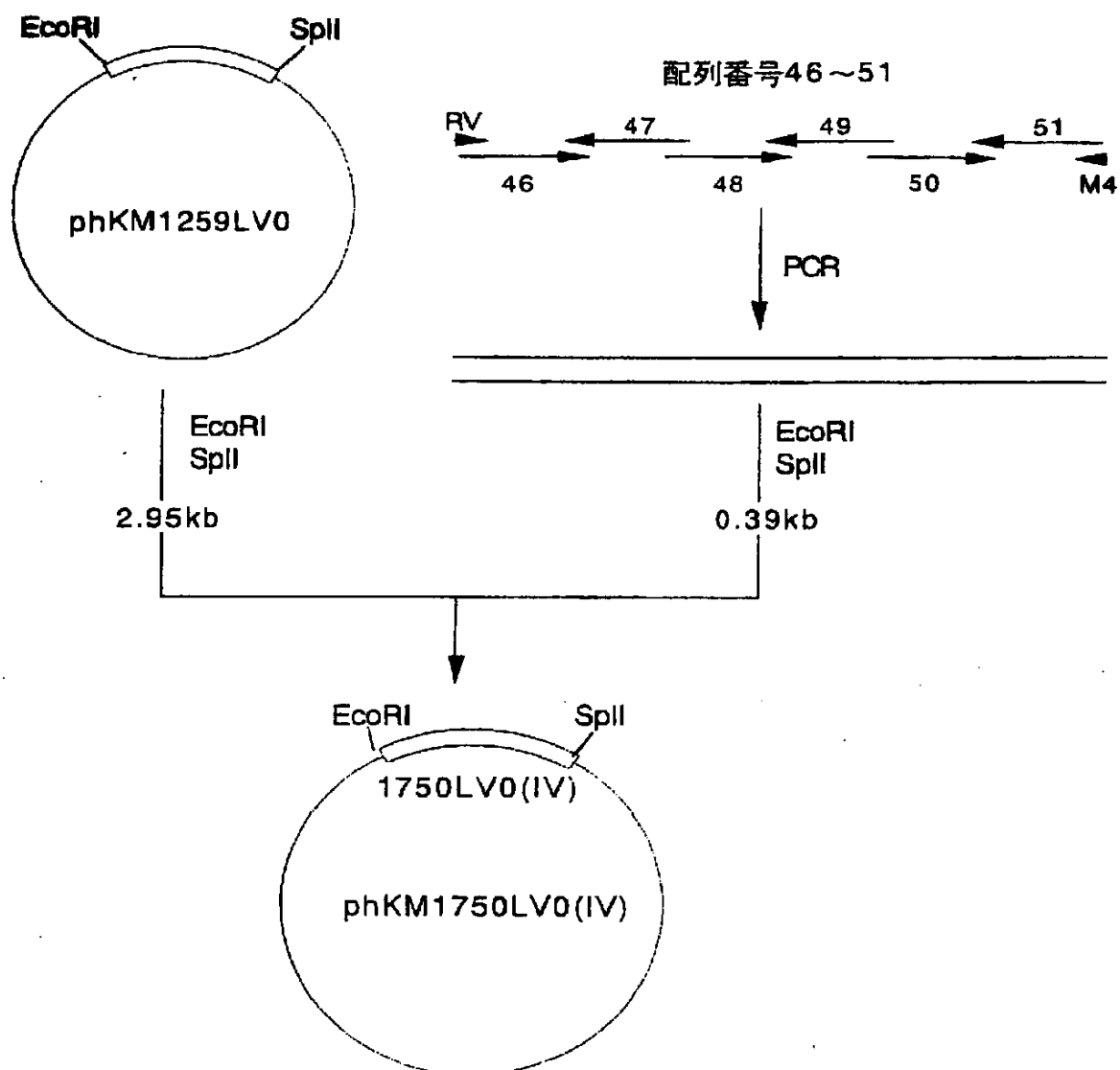
## 第 26 図



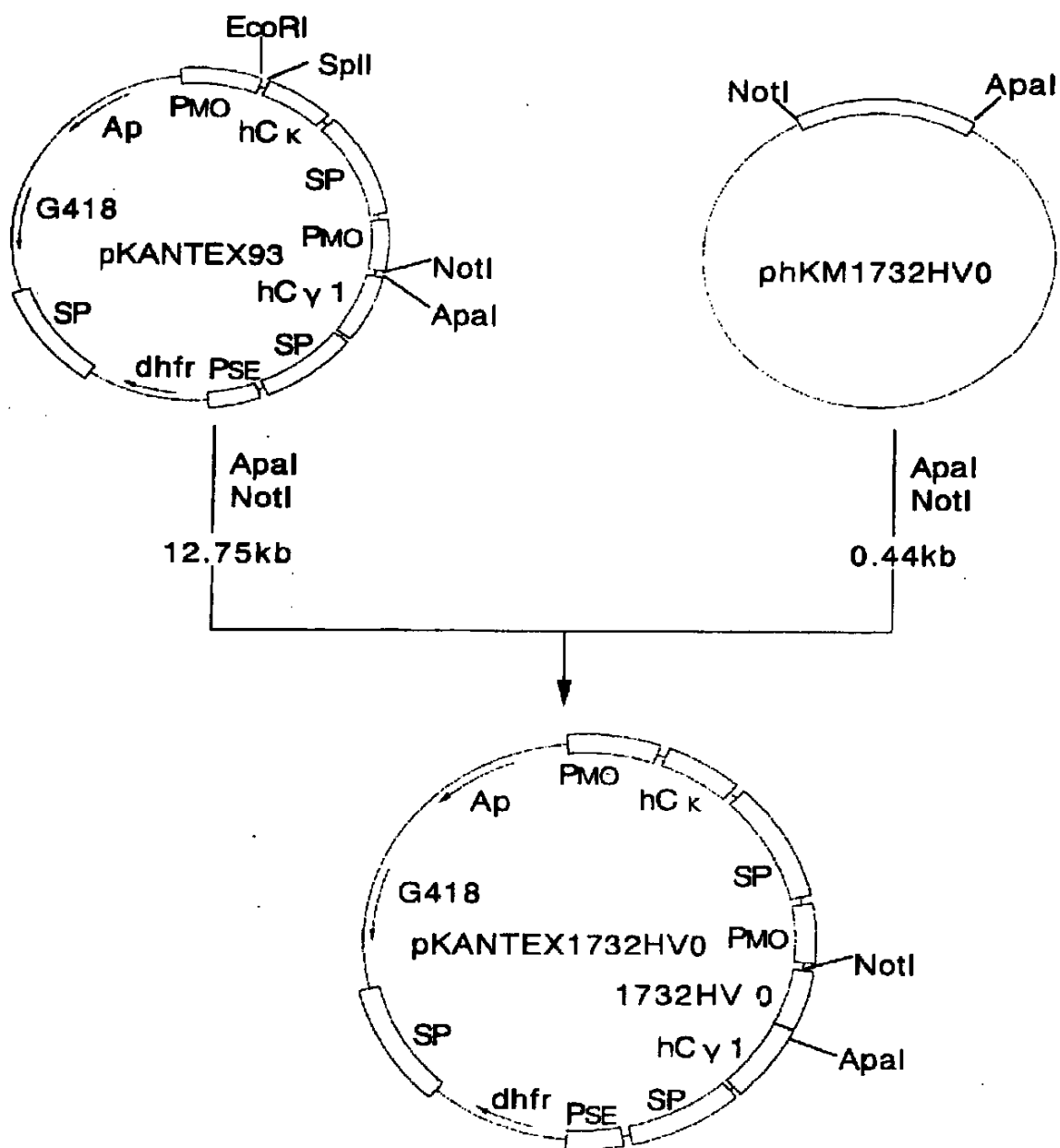
## 第 27 図



## 第 28 図

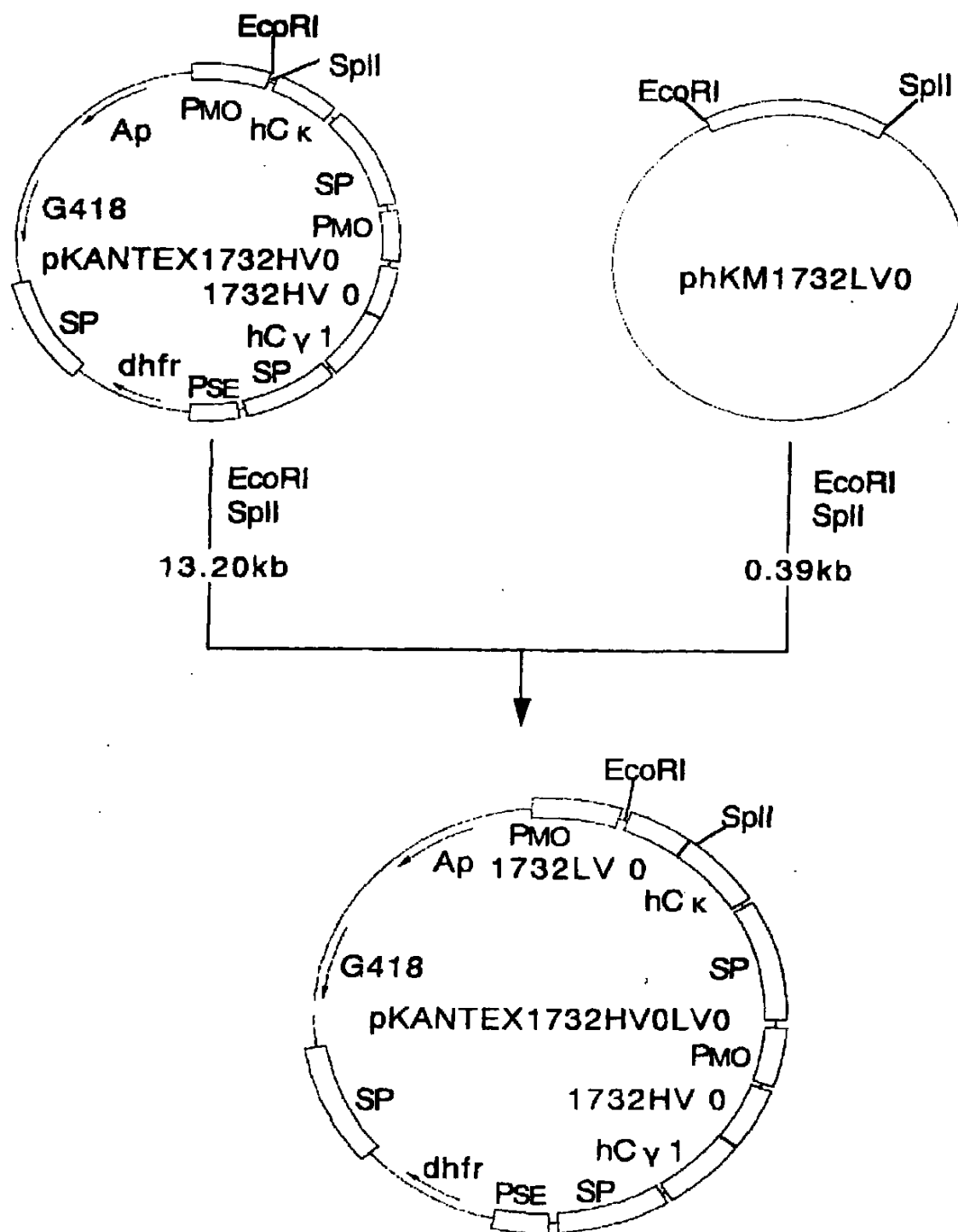


## 第 29 図

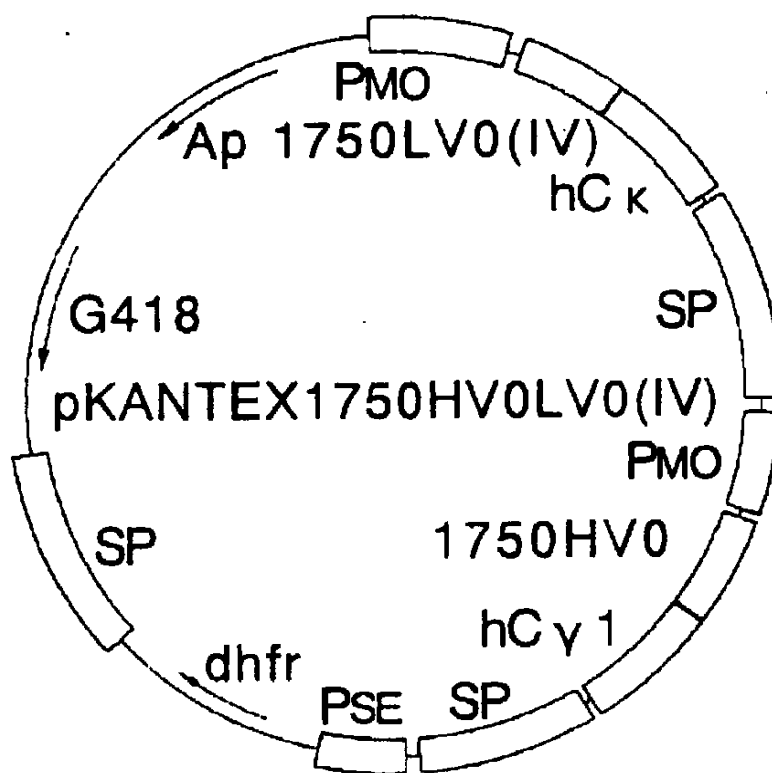




## 第 30 図

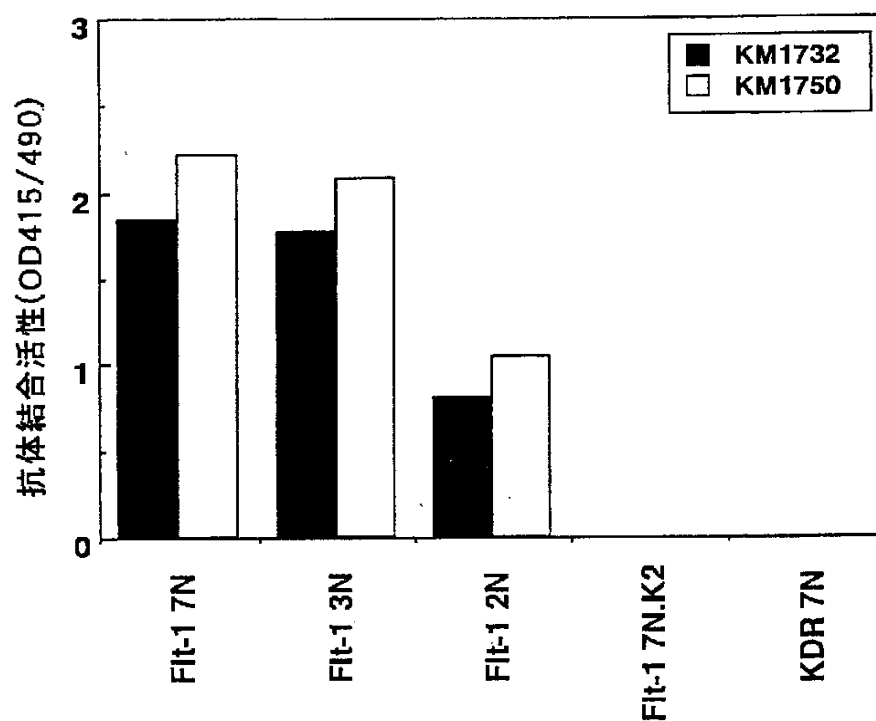


## 第 31 図

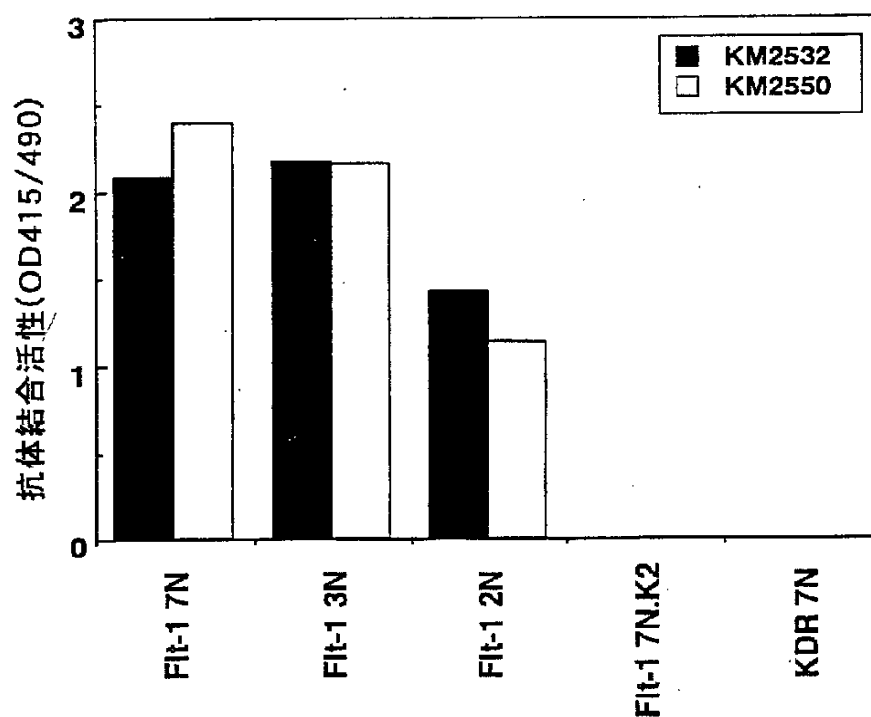


## 第 32 図

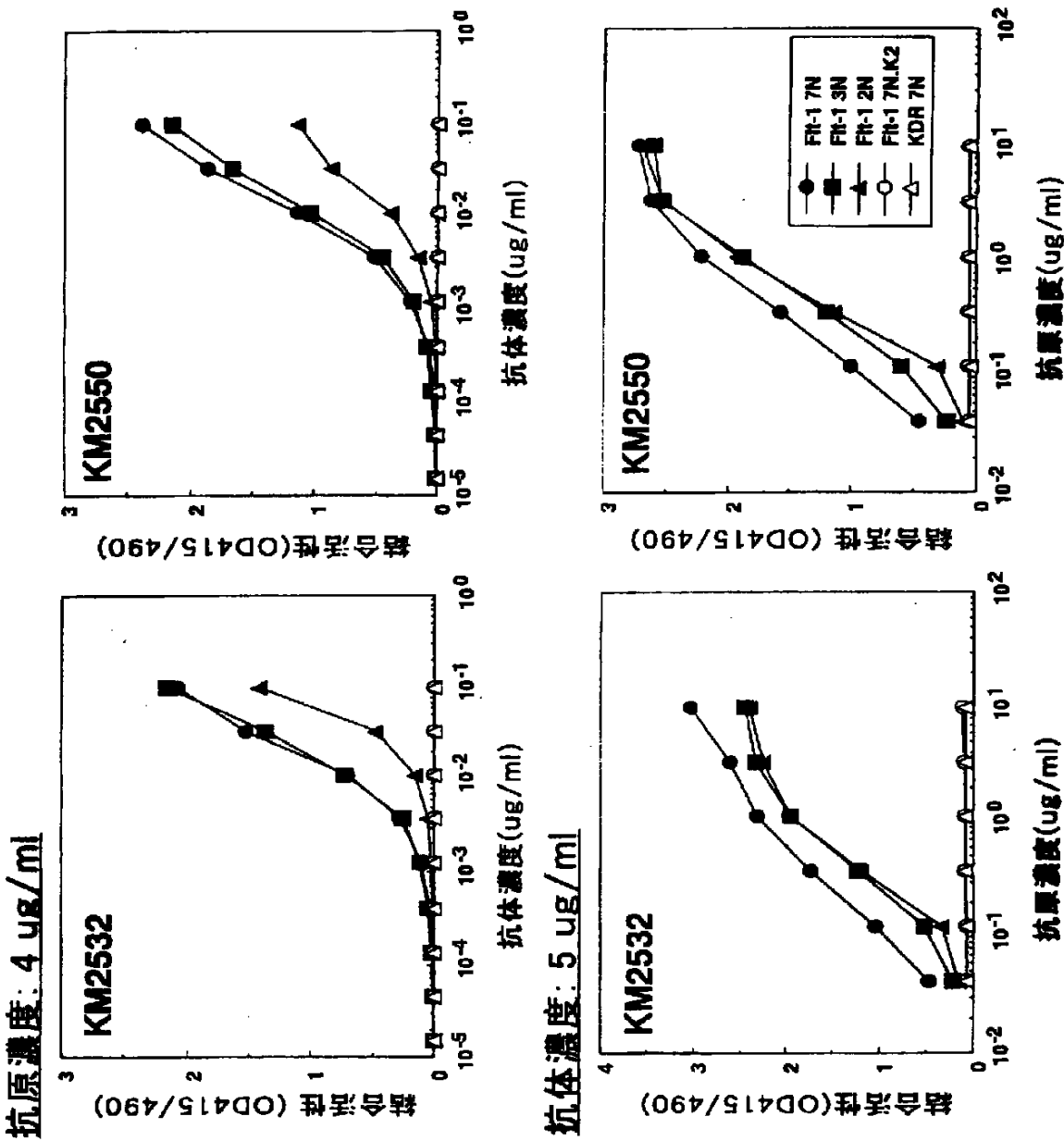
## マウスモノクローナル抗体



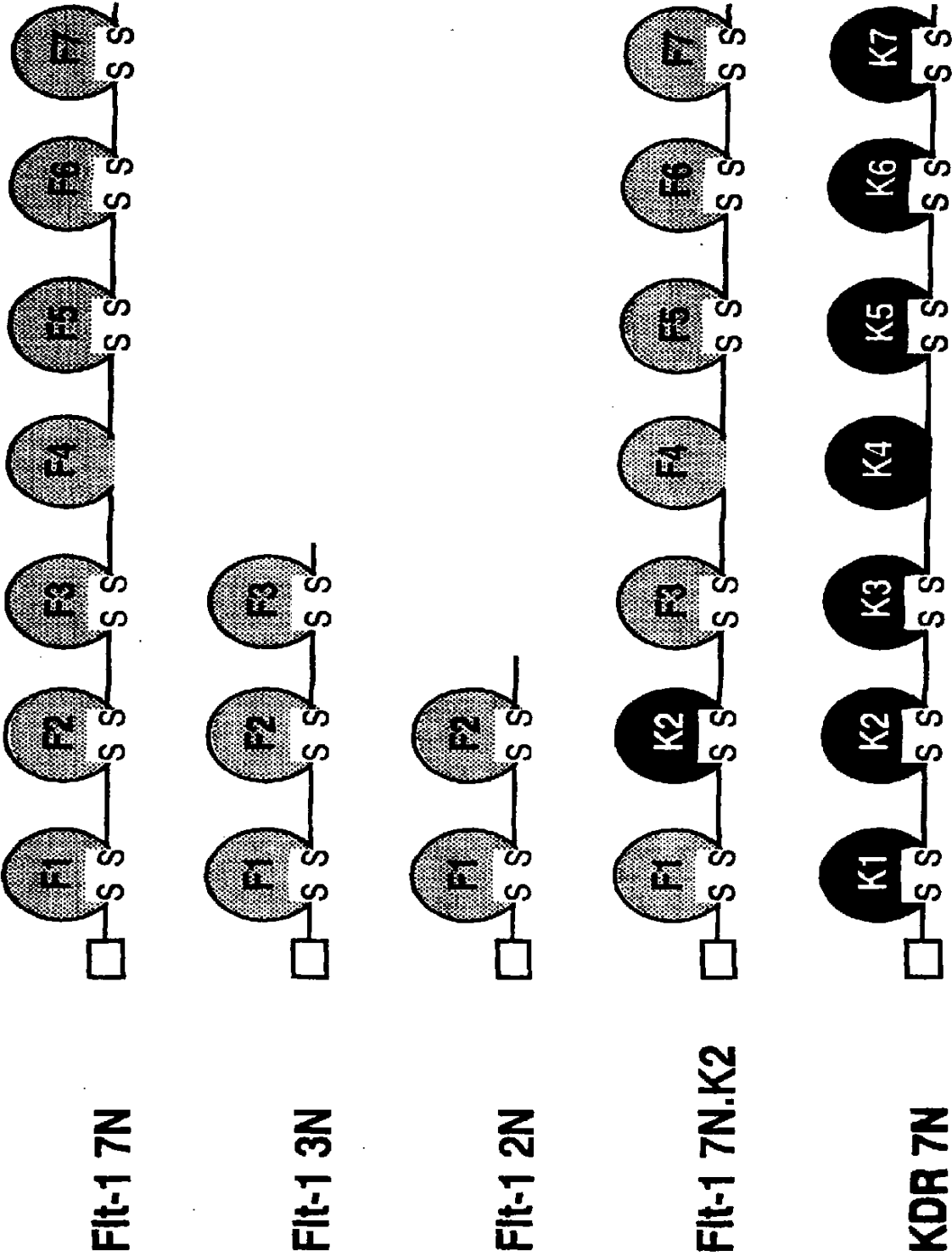
## キメラ抗体



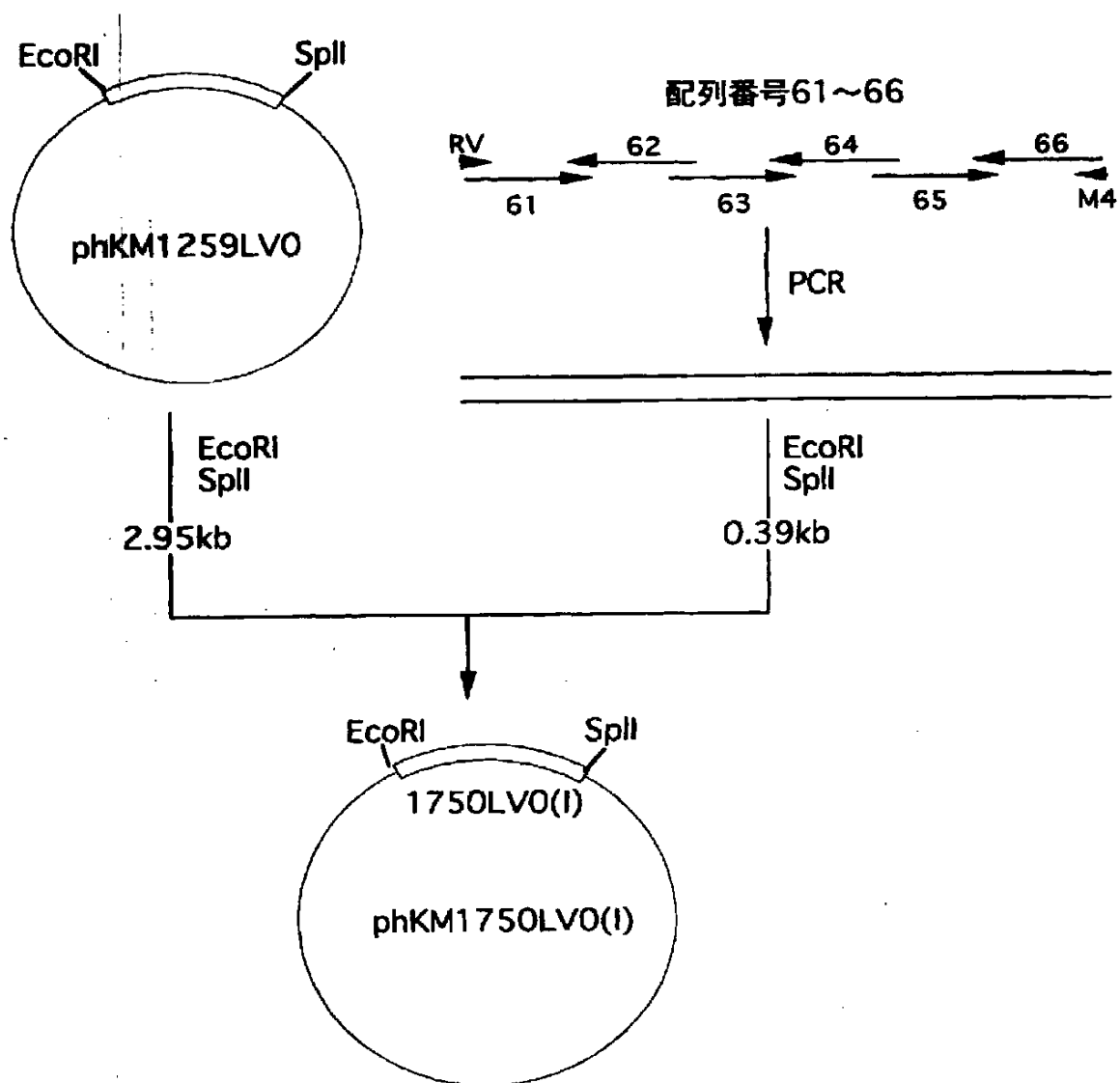
第 33 図



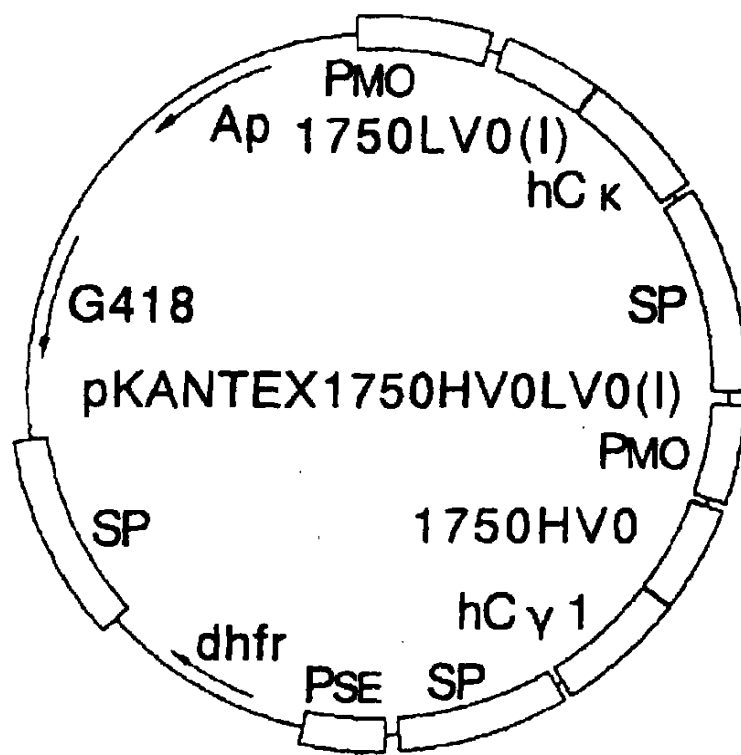
第 34 図



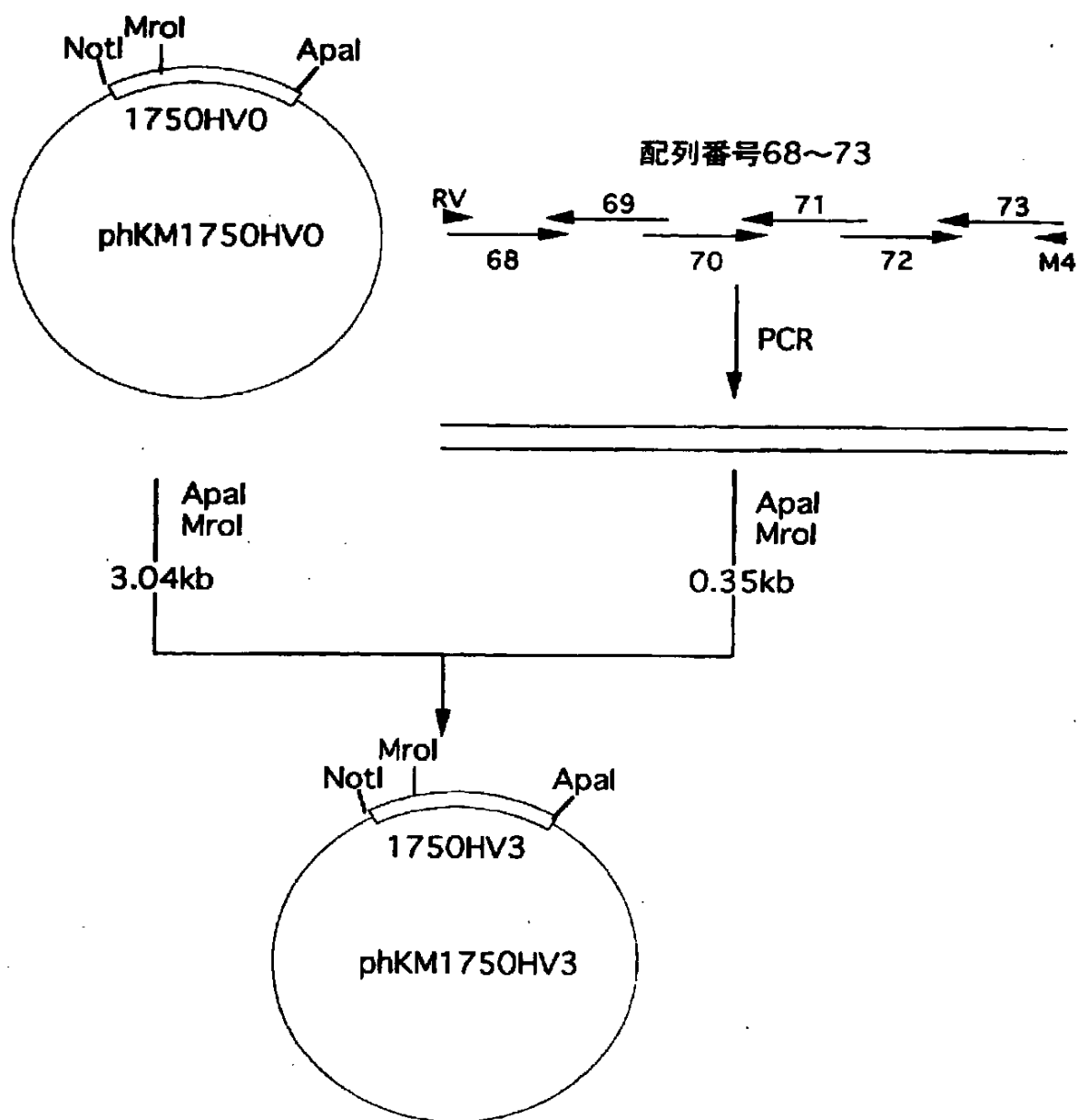
## 第 35 図



## 第 36 図

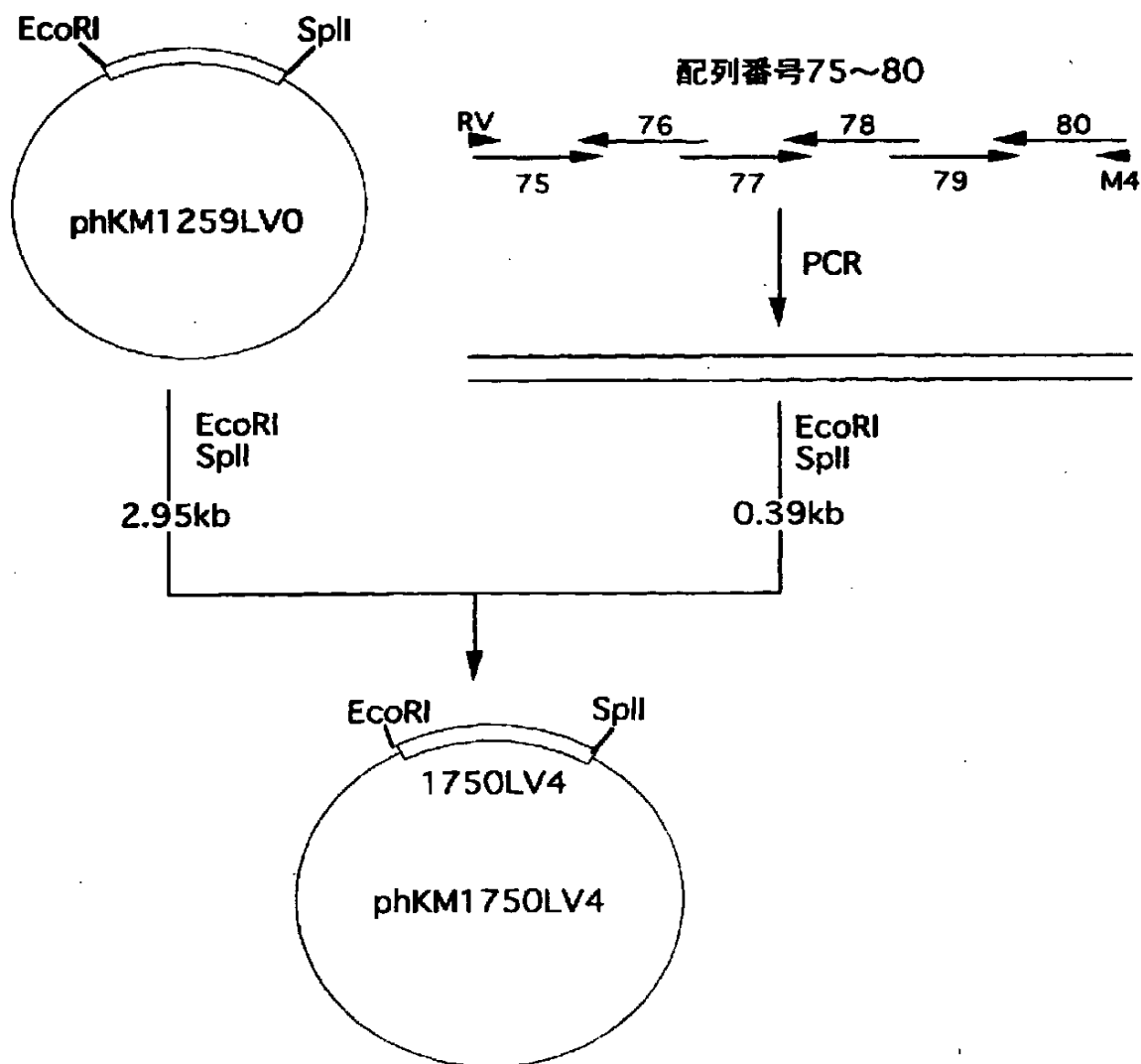


## 第 37 図

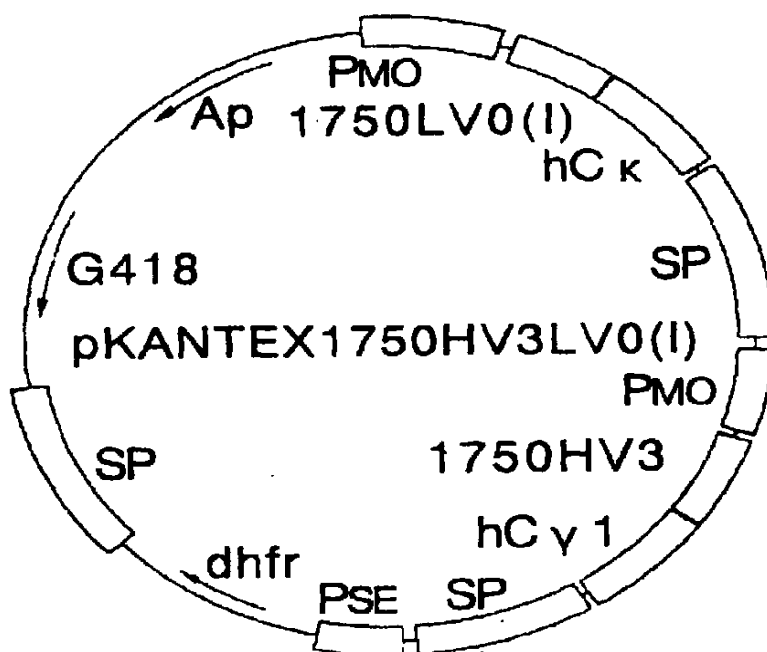




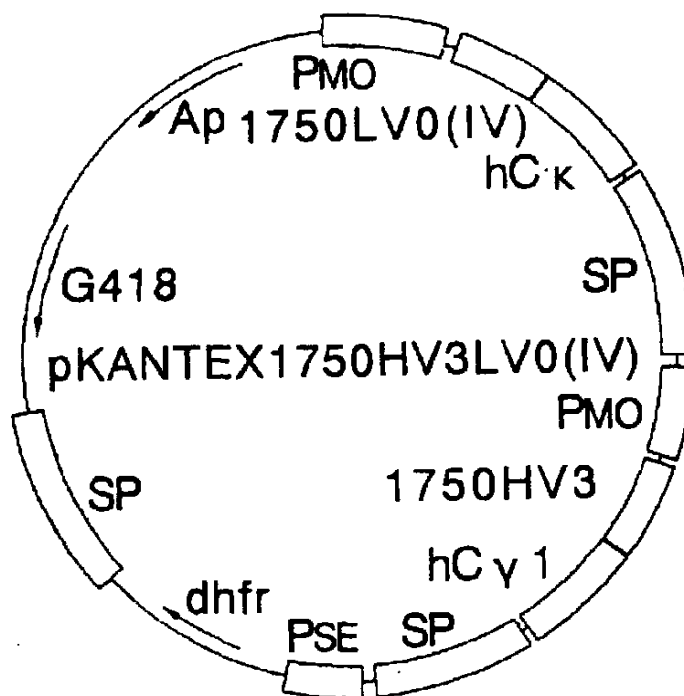
## 第 38 図



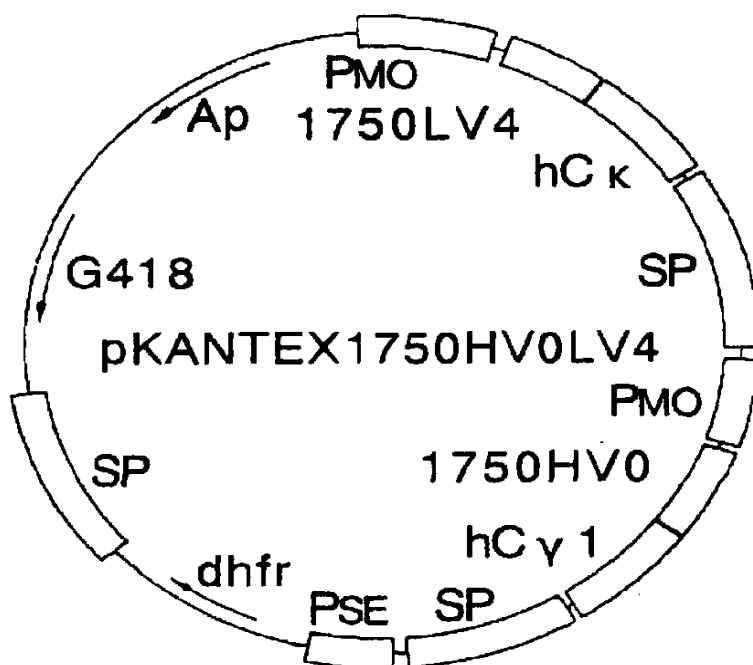
第 39 図



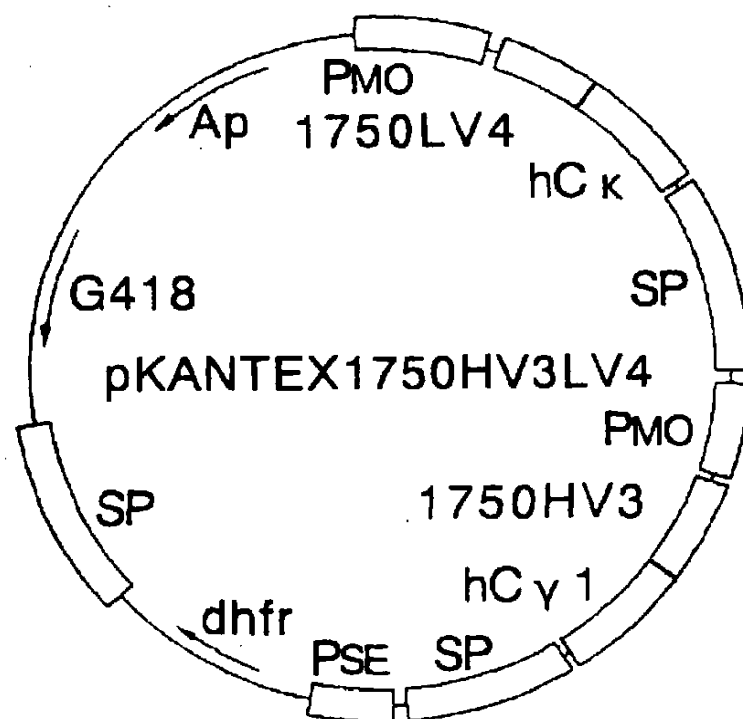
第 40 図



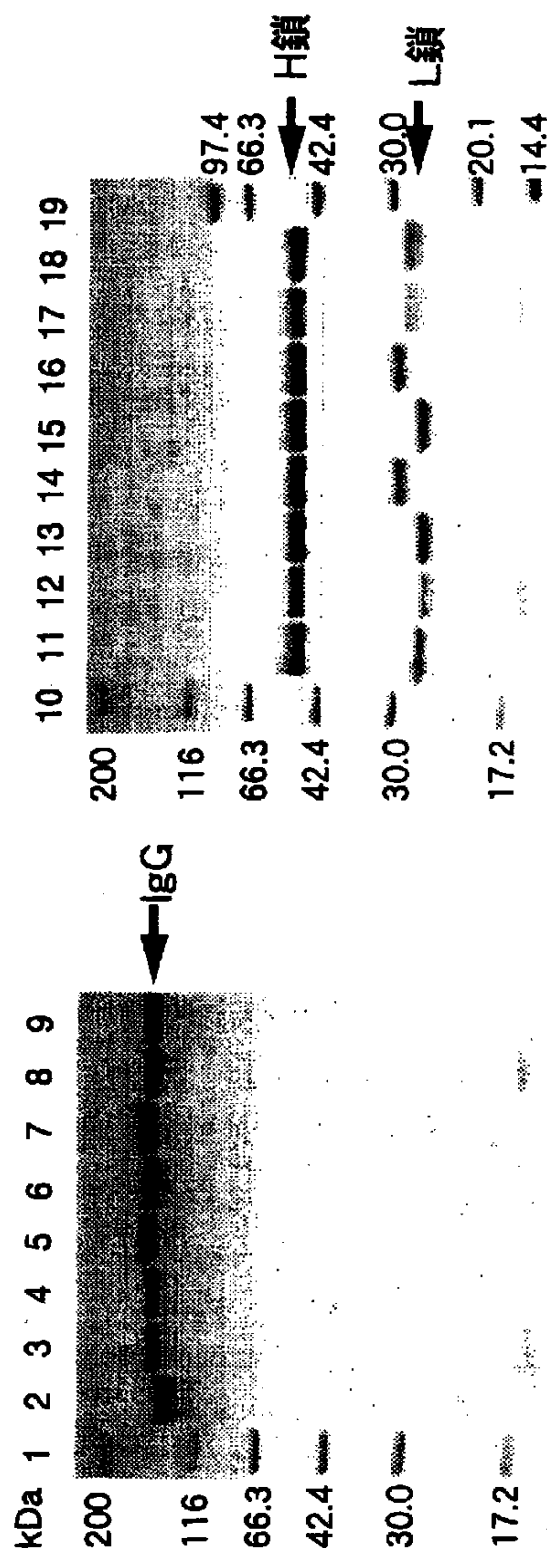
第 41 図



第 42 図



第 43 図



非還元条件

還元条件

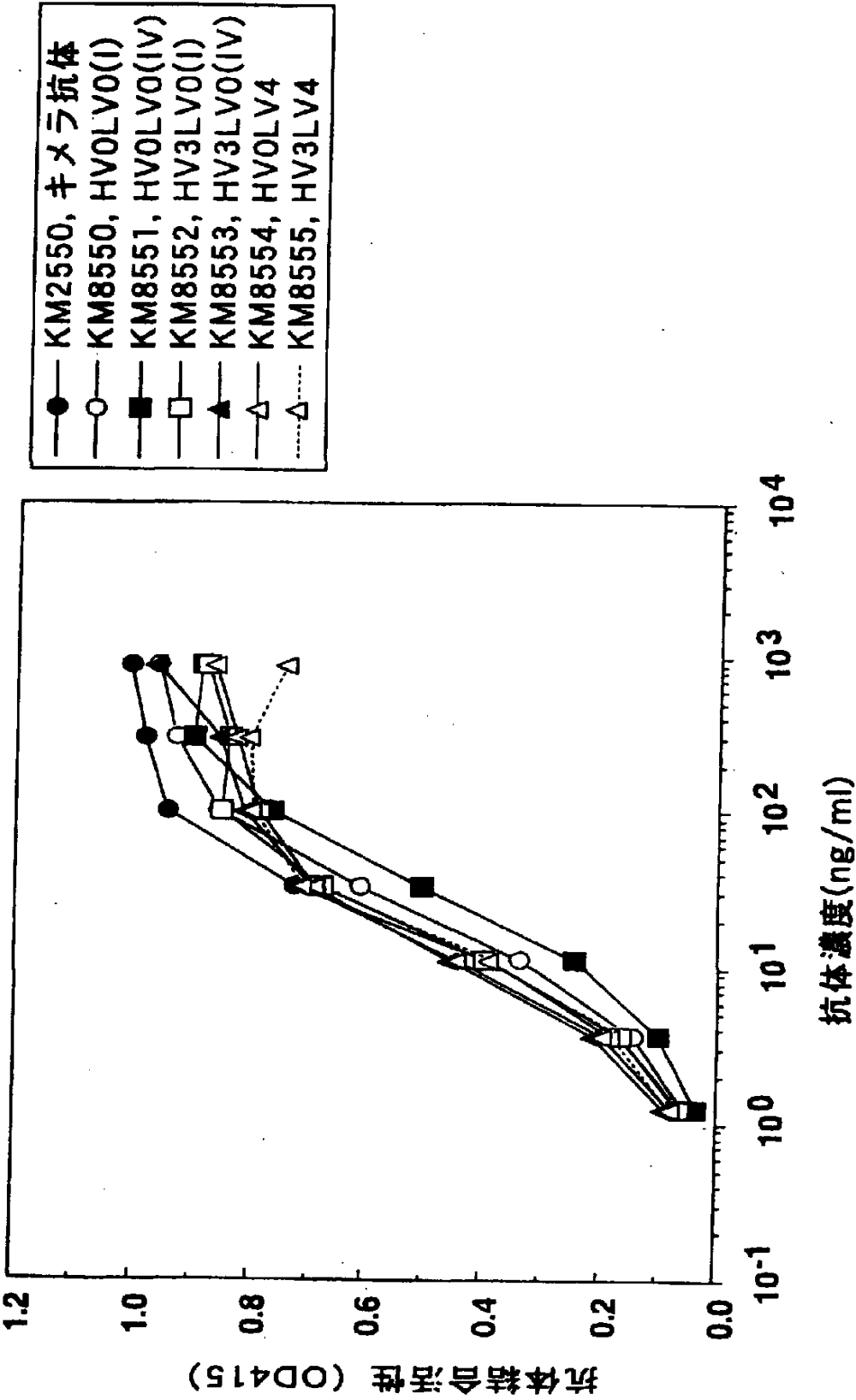
レーン1：分子量マーカー、高分子

- 2：KM8969
- 3：KM2550, キメラ抗体
- 4：KM8550, HVOLV0 (I)
- 5：KM8551, HVOLV0 (IV)
- 6：KM8552, HV3LV0 (I)
- 7：KM8553, HV3LV0 (IV)
- 8：KM8554, HVOLV4
- 9：KM8555, HV3LV4

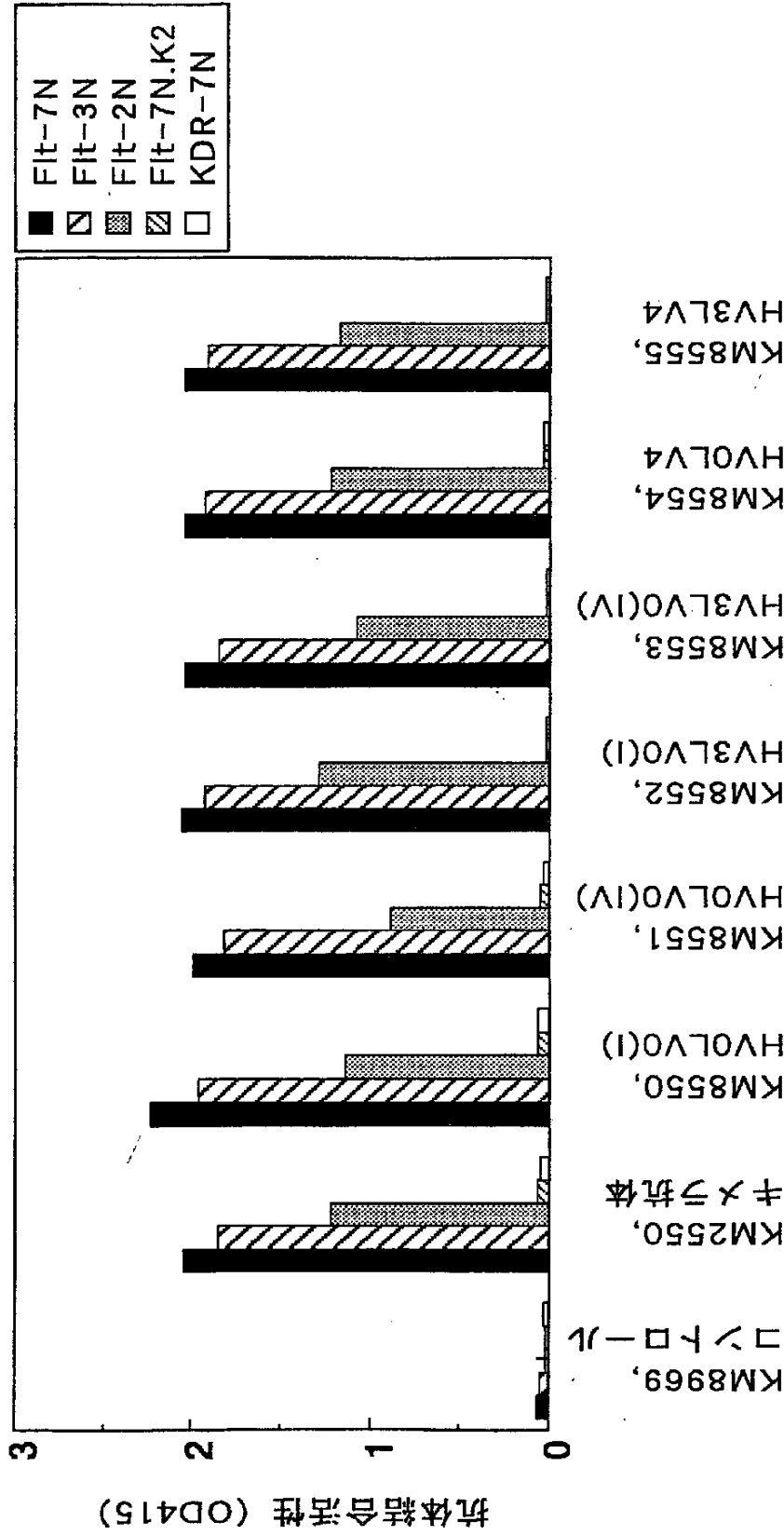
レーン10：分子量マーカー、高分子

- 11：KM8969
- 12：KM2550, キメラ抗体
- 13：KM8550, HVOLV0 (I)
- 14：KM8551, HVOLV0 (IV)
- 15：KM8552, HV3LV0 (I)
- 16：KM8553, HV3LV0 (IV)
- 17：KM8554, HVOLV4
- 18：KM8555, HV3LV4
- 19：分子量マーカー、低分子

第 44 図

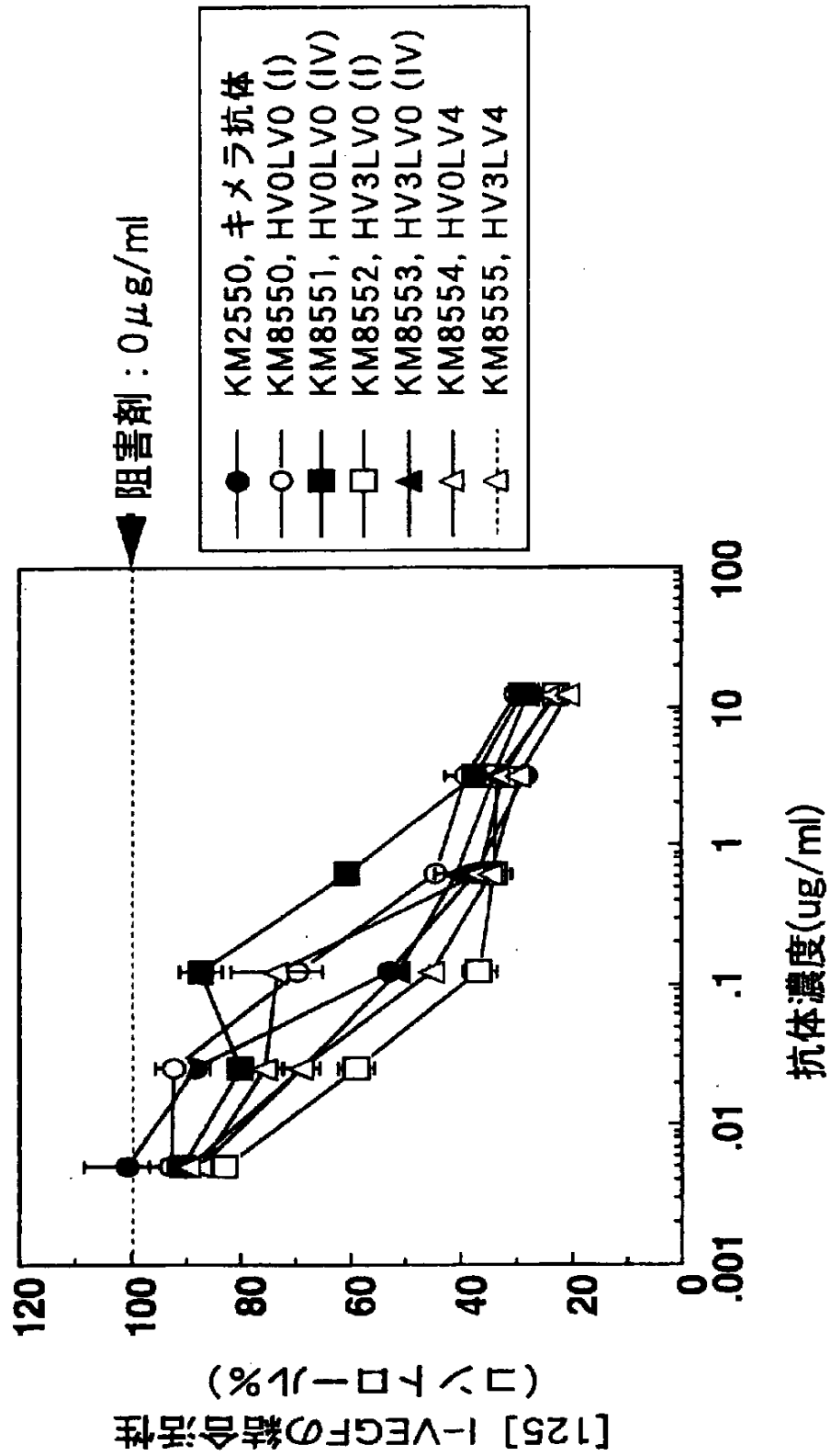


第 45 図



第 46 図

VEGF-可溶性Fit-1結合実験系



第 47 図

H鎖

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
1750 mouse	1	QAFLLQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFI	NYNMH	WVKQTPRQGLEWIG	AIFPGNGFTSY 60
1750 HV0	1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFI	NYNMH	WVRQAPGQGLEWMG	AIFPGNGFTSY 60
1750 HV3	1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFI	NYNMH	WVRQAPGQGLEWMG	AIFPGNGFTSY 60
	FR3	CDR3	FR4		
61	NQKFKG	KATLTVDKSSSTVYNQLRSLTSEDSAVYFCAR	DGDYYFDY	WGQGTTLTVSS	117
61	NQKFKG	RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	DGDYYFDY	WGQGTTLTVSS	117
61	NQKFKG	RVTITVDKSTSTAYMQLRSLRSEDTAVYFCAR	DGDYYFDY	WGQGTTLTVSS	117
		8284	95		



L鎖

FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3  
1750 mouse 1 QIVLTQSPAIMSASLGEEITLTC SASSSVSYNH WYQOKSGTSPKLLIY RTSNLAS GVPFR 60  
1750 LV0(I) 1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC SASSSVSYNH WYQOKPGKAPKLLIY RTSNLAS GVPFR 60  
1750 LV4 1 DIQMTQSPSSLSASVGEETITC SASSSVSYNH WYQOKPGKAPKLLIY RTSNLAS GVPFR 60

1718

CDR3 FR4  
61 FSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAAYYC HQWSMYT FGGGTKLEIKR 105  
61 FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC HQWSMYT FGGGTKVEIKR 105  
61 FSGSGSGTFYTLTISSLQPEDFATYYC HQWSMYT FGGGTKVEIKR 105

6970

FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3  
1750 mouse 1 QIVLTQSPAIMSASLGEEITLTC SASSSVSYNH WYQOKSGTSPKLLIY RTSNLAS GVPFR 60  
1750 LV0(IV) 1 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC SASSSVSYNH WYQOKPGQPPKLLIY RTSNLAS GVPDR 60

CDR3 FR4  
61 FSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAAYYC HQWSMYT FGGGTKLEIKR 105  
61 FSGSGSGTDFTLTISSLQAEADVAVYYC HQWSMYT FGGGTKVEIKR 105

配 列 表  
SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Diagnostic and therapeutic agents for the diseases related monocytes and macrophages

<130> 11214W01

<140>

<141>

<150> H11-171709

<151> 1999-06-17

<160> 92

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 415

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(414)

<400> 1

```

atg gaa tgg aac tgg gtc gtt ctc ttc ctc ctg tca tta act gca ggt 48
Met Glu Trp Asn Trp Val Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Thr Ala Gly
-19          -15          -10          -5
gtc tat gcc cag ggt cag atg cag cag tct gga gct gag ctg gtg aag 96
Val Tyr Ala Gln Gly Gln Met Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
      -1  1          5          10
cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag cct tct ggc ttc acc ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Pro Ser Gly Phe Thr Phe
      15          20          25
agt agt aac tat ata agt tgg ttg aag cag aag cct gga cag agt ctt 192
Ser Ser Asn Tyr Ile Ser Trp Leu Lys Gln Lys Pro Gly Gln Ser Leu
      30          35          40          45

```

```

gag tgg att gct tgg att tat gct gga act ggt gat gcc agc tat aat 240
Glu Trp Ile Ala Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn
                    50                      55                      60
cag aag ttc aca gcc aag gcc cac gtg act gta gac aca tcc tcc agc 288
Gln Lys Phe Thr Ala Lys Ala His Val Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser
                    65                      70                      75
aca gcc tac atg cag ttg agt agc ctg aca act gag gac tct gcc atc 336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile
                    80                      85                      90
tat tac tgt gca cga cac ggg ggg gac ggc tac tgg ttt gct tac tgg 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Gly Asp Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp
                    95                      100                      105
ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca g
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
110                      115                      119

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 385

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(384)

&lt;400&gt; 2

```

atg gat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
-22      -20                      -15                      -10
gtc ata ata tcc aga gga caa ctt gtt ctc acc cag tct cca gca atc 96
Val Ile Ile Ser Arg Gly Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
      -5                      -1  1                      5                      10
atg tct gca tct caa ggg gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc agc 144
Met Ser Ala Ser Gln Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
                      15                      20                      25
tca agt gtc agt tac atg cac tgg tac cag cag aag tca ggc acc tcc 192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
                      30                      35                      40
ccc aaa aga tgg att tat gac aca tcc aaa ctg cct tct ggt gtc cct 240
Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Pro Ser Gly Val Pro
          45                      50                      55

```

```

gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc 288
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
    60                65                70
agc agc atg gag gct gaa gat gct gcc act tat tat tgc cag cag tgg 336
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
    75                80                85                90
agt agt aac cca ccc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gaa ctg aaa 384
Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
                95                100                105 106
c                                                                385

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 409

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(408)

&lt;400&gt; 3

```

atg gga ttc agc agg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gtg act aca ggt 48
Met Gly Phe Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly
-19                -15                -10                -5
gtc cac tcc cag gct ttt cta cag cag tct ggg gct gag ctg gtg agg 96
Val His Ser Gln Ala Phe Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
    -1  1                5                10
cct ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
    15                20                25
atc aat tac aat atg cac tgg gta aag cag aca cct aga cag ggc ctg 192
Ile Asn Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu
    30                35                40                45
gaa tgg att gga gct att ttt cca gga aat ggt ttt act tcc tac aat 240
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn
                50                55                60
cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc 288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
                65                70                75
aca gtc tac atg cag ctc cgc agc ctg aca tct gaa gac tct gcg gtc 336
Thr Val Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

```

80	85	90	
tat ttc tgt gca aga gat ggt gac	tat tac ttt gac tac tgg ggc caa	384	
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Asp	Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
95	100	105	
ggc acc act ctc aca gtc tcc tca g		409	
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
110	115	117	

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 379

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(378)

&lt;400&gt; 4

atg gat ttt cag gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser	
-22 -20 -15 -10	
gtc ata atg tcc aga gga caa att gtt ctc acc cag tcg cca gca atc	96
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile	
-5 -1 1 5 10	
atg tct gca tct cta ggg gag gag atc acc cta acc tgc agt gcc agc	144
Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser	
15 20 25	
tcg agt gta agt tac atg cac tgg tac cag cag aag tca ggc act tct	192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser	
30 35 40	
ccc aaa ctc ttg att tat aga aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct	240
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro	
45 50 55	
ttt cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc ttt tat tct ctc aca atc	288
Phe Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile	
60 65 70	
agc agt gtg gag gct gaa gat gct gcc gat tat tac tgc cat cag tgg	336
Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp	
75 80 85 90	
agt atg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c	379
Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	

95

100

104

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 5

Ser Asn Tyr Ile Ser

1

5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 6

Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Thr

1

5

10

15

Ala

17

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 7

His Gly Gly Asp Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr

1

5

10

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 8

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
1 5 10

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 9

Asp Thr Ser Lys Leu Pro Ser  
1 5 7

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 10

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr  
1 5 9

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 11

Asn Tyr Asn Met His  
1 5

<210> 12  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<223>

<400> 12  
Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15  
Gly  
17

<210> 13  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<223>

<400> 13  
Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 8

<210> 14  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<223>

<400> 14  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
1 5 10

<210> 15  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>



<223>

<400> 15

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5 7

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223>

<400> 16

His Gln Trp Ser Met Tyr Thr  
1 5 7

<210> 17

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

gcccaagggac tctggtcact gtctctgcag cctccaccaa gggcc

45

<210> 18

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

cttggtggag gctgcagaga cagtgaccag agtcccttgg c

41

<210> 19

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

cttattattg ccagcagtgg agtagtaacc caccacggtt cggctgctggg accaagctgg 60  
aactgaaac 69

<210> 20

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

gtacgtttca gttccagctt ggtcccagca ccgaacgtgg gtgggttact actccactgc 60  
tggaataat aagt 74

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

tcagcctcca ccaagggcc 19

<210> 22

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

cttggtggag g 11

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 23

cgttcggagg ggggaccaag ctggaaataa aac

33

<210> 24

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 24

gtacgtttta tttccagctt ggtccccct ccgaa

35

<210> 25

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25

caggaaacag ctatgacgcg gccgccacca tggaatggaa ctgggtcggt ctcttcctcc 60  
tgtcattaac tgcaggtgtc tatgcccagg tgca

94

<210> 26

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

gtgtatccag aagccttgca ggagaccttc actgaggcgc caggtttctt cacctcagcc 60  
ccagactgca ccagctgcac ctgggcatag acacc

95

<210> 27

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 27

tgcaaggctt ctggatacac cttcagcagt aactatataa gttgggtgcg acaggcccct 60  
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatt tatg 94

<210> 28

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28

aggctgtgct cgtggatgtg tcgacggtaa tggtagctct ggctgtgaac ttctgattat 60  
agctggcatc accagttcca gcataaatcc atcccatcca c 101

<210> 29

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29

cacatccacg agcacagcct acatggagct gacgagcctg agatctgagg acacggccgt 60  
gtattactgt gcgagacacg ggggggacgg ctactggttt 100

<210> 30

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 30

gttttcccag tcacgacggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgacc agggttccct 60  
ggccccagta agcaaaccag tagccgtccc ccc 93

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 421

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(420)

&lt;400&gt; 31

atg gaa tgg aac tgg gtc gtt ctc ttc ctc ctg tca tta act gca ggt 48  
Met Glu Trp Asn Trp Val Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Thr Ala Gly  
-19 -15 -10 -5  
gtc tat gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96  
Val Tyr Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
-1 1 5 10  
cct ggc gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
15 20 25  
agc agt aac tat ata agt tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192  
Ser Ser Asn Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
30 35 40 45  
gag tgg atg gga tgg att tat gct gga act ggt gat gcc agc tat aat 240  
Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn  
50 55 60  
cag aag ttc aca gcc aga gtc acc att acc gtc gac aca tcc acg agc 288  
Gln Lys Phe Thr Ala Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser  
65 70 75  
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
80 85 90  
tat tac tgt gcg aga cac ggg ggg gac ggc tac tgg ttt gct tac tgg 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Gly Asp Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp  
95 100 105  
ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca g 415  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115

<210> 32  
<211> 96  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32  
caggaaacag ctatgacgcg gccgccacca tgggattcag caggatcttt ctcttctctcc 60  
tgtcagtgac tacaggtgtc cactcccagg tgcagc 96

<210> 33  
<211> 94  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33  
ggtgtatcca gaagccttgc aggagacctt cactgaggcc ccaggtctct tcacctcage 60  
tccggactgc accagctgca cctgggagtg gaca 94

<210> 34  
<211> 90  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34  
gcaaggcttc tggatacacc ttcattaatt acaatatgca ctgggtgcga caggccccctg 60  
gacaagggtc tgagtggatg ggagctatct 90

<210> 35  
<211> 90  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35  
tgtgctcgtg gacttgtcga cggtaatggt gactctgcc ttgaacttct gattgtagga 60  
agtaaaacca tttcctggaa aaatagctcc 90

<210> 36  
<211> 95  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36  
tcgacaagtc cacgagcaca gcctacatgg agctgagcag cctgagatct gaggacacgg 60  
ccgtgtatta ctgtgcgaga gatggtgact attac 95

<210> 37  
<211> 96  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37  
gttttcccag tcacgacggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgacc agggttccct 60  
ggccccagta gtcaaagtaa tagtcacat ctctcg 96

<210> 38  
<211> 409  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(408)

<400> 38  
atg gga ttc agc agg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gtg act aca ggt 48  
Met Gly Phe Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly

```

-19          -15          -10          -5
gtc cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tcc gga gct gag gtg aag aag 96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

          -1   1              5              10
cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

          15              20              25
att aat tac aat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192
Ile Asn Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

          30              35              40              45
gag tgg atg gga gct att ttt cca gga aat ggt ttt act tcc tac aat 240
Glu Trp Met Gly Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn

          50              55              60
cag aag ttc aag ggc aga gtc acc att acc gtc gac aag tcc acg agc 288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser

          65              70              75
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

          80              85              90
tat tac tgt gcg aga gat ggt gac tat tac ttt gac tac tgg ggc cag 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

          95              100              105
gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca g
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110              115              117

```

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 39

```

caggaaacag ctatgacgaa ttccaccatg gattttcaag tgcagatttt cagcttcctg 60
ctaatacgtg cctcagtcac aatatcc

```

87

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 93

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;



<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

aagtgatggt gactctgtct cctacagatg cagacagga ggatggagac tgggtcatct 60  
ggatatctcc tetggatatt atgactgagg cac 93

<210> 41

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 41

agacagagtc accatcactt gtagtgctag ctcaagtgic agttacatgc actggtatca 60  
gcagaaacca gggaaagccc ctaag 85

<210> 42

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

atccactgcc gctgaacctt gatgggaccc cagaaggcag tttggatgtg tcatagatca 60  
gaagcttagg ggctttccct ggtt 84

<210> 43

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43

aaggttcagc ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc accatcagca gcctgcagcc 60  
tgaagatddd gcaacttatt actgtcagca gtgg 94

<210> 44

<211> 91

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 44

gttttccag tcacgaccgt acgtttgatc tctaccttgg tcccttggcc gaacgtgggt 60  
 gggttactac tccactgctg acagtaataa g 91

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 385

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(384)

&lt;400&gt; 45

atg gat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48  
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 -22 -20 -15 -10  
 gtc ata ata tcc aga gga gat atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc 96  
 Val Ile Ile Ser Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 -5 -1 1 5 10  
 ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gct agc 144  
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser  
 15 20 25  
 tca agt gtc agt tac atg cac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc 192  
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
 30 35 40  
 cct aag ctt ctg atc tat gac aca tcc aaa ctg cct tct ggg gtc cca 240  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Pro Ser Gly Val Pro  
 45 50 55  
 tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc 288  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 60 65 70  
 agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag tgg 336  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 75 80 85 90



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 49

cagaccgct gccactgaat cggtcaggga cccagaagc caggttgat gttctgtaaa 60  
tgagcagctt aggaggctgt cctgggtt 87

<210> 50

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 50

attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc atcagcagcc tgcaggctga 60  
agacgtcgca gtttattact gtcac 86

<210> 51

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 51

gtttcccag tcacgaccgt acgtttgate tccaccttgg tcccttggcc gaacgtgtac 60  
atactccact gatgacagta ataaactgcg 90

<210> 52

<211> 379

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(378)

&lt;400&gt; 52

atg gat ttt cag gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser	
-22       -20                               -15                               -10	
gtc ata atg tcc aga gga gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc	96
Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser	
-5                               -1    1                               5                               10	
ctg gct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc agt gcc agc	144
Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Ser Ala Ser	
15                               20                               25	
tcg agt gta agt tac atg cac tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct	192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro	
30                               35                               40	
cct aag ctg ctc att tac aga aca tcc aac ctg gct tct ggg gtc cct	240
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro	
45                               50                               55	
gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc	288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	
60                               65                               70	
agc agc ctg cag gct gaa gac gtc gca gtt tat tac tgt cat cag tgg	336
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp	
75                               80                               85                               90	
agt atg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gag atc aaa c	379
Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95                               100                               104	

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 53

ctctagag

8

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 54

cagtgttctt ggctgtgcaa aaagtgagg cattttcat aatagaaggt gcctacgtag 60

<210> 55

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 55

gacctacgt aggcaccttc tattatgaaa aatgcctcca ctttgcaca gccagaaca 60  
ctgcatg 67

<210> 56

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 56

GTATAATGAG CGGCCGCG 18

<210> 57

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 57

gatccgcggc cgctcattat ac 22

<210> 58

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 58

gaaggaaaca gaaggcgcca tctatatatt tattcgaggt accaatataa tcatag 56

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 59

aaactgactt ggccggcgcc atttatgtct 30

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 60

cataaatcct ataggtacca acgacaacta 30

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 61

caggaaacag ctatgacgaa ttccaccatg gattttcaag tgcagatttt cagcttcctg 60  
ctaatcagtg cctcagtcac aatatacc 87

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 93

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 62

aagtgatggt gactctgtct cctacagatg cagacaggga ggatggagac tgggtcatct 60  
ggatatctcc tctggatatt atgactgagg cac 93

<210> 63

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 63

agacagagtc accatcactt gtagtgccag ctcgagtgtgta agttacatgc actggtatca 60  
gcagaaacca gggaaagccc ctaag 85

<210> 64

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 64

atccactgcc getgaacctt gatgggaccc cagaagccag gttggatgtt ctatagatca 60  
gaagcttagg ggctttccct gggt 84

<210> 65

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 65

aaggttcagc ggcagtggat ctgggacaga ttctactctc accatcagca gcctgcagcc 60  
tgaagatttt gcaacttatt actgtcatca gtgg 94



<210> 66  
 <211> 85  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 66  
 gttttcccg tcacgaccgt acgtttgatc tctaccttgg tcccttggcc gaacgtgtac 60  
 atactccact gatgacagta ataag 85

<210> 67  
 <211> 379  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(378)

<400> 67  
 atg gat ttt caa gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca 48  
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 -22 -20 -15 -10  
 gtc ata ata tcc aga gga gat atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc 96  
 Val Ile Ile Ser Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 -5 -1 1 5 10  
 ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt agt gcc agc 144  
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser  
 15 20 25  
 tcg agt gta agt tac atg cac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc 192  
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
 30 35 40  
 cct aag ctt ctg atc tat aga aca tcc aac ctg gct tct ggg gtc cca 240  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 45 50 55  
 tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc 288  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 60 35 70  
 agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cat cag tgg 336

Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Trp	
75					80					85					90	
agt	atg	tac	acg	ttc	ggc	caa	ggg	acc	aag	gta	gag	atc	aaa	c		379
Ser	Met	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
				95					100				104			

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 68

caggaaacag ctatgactcc ggagctgagg tgaagaagcc tggggcctca gtgaaggtct 60  
 cctgcaaggc ttctggatac 80

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 69

ccactcaagc ccttgctcag gggcctgtcg caccagtgatc atattgtaat taatgaaggt 60  
 gatatccagaa gccttgacag 80

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 81

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 70

ctggacaagg gcttgagtgg atgggagcta tttttccagg aaatggtttt acttcctaca 60  
 atcagaagtt caagggcaga g 81

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 71

tctcaggctg cgcagctgca ttaggctgt gtcgtggac ttgtcgacgg taatggtagac 60  
tctgcccttg aacttctga 79

<210> 72

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 72

tgcagctgcg cagcctgaga tctgaggaca cggccgtgta tttctgtgcg agagatggtag 60  
actattactt tgactactgg ggc 83

<210> 73

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 73

gttttcccag tcacgacggg cccttggtgg aggotgagga gacggtgacc agggttccct 60  
ggccccagta gtcaaagtaa t 81

<210> 74

<211> 409

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>

<221> CDS

&lt;222&gt; (1)..(408)

&lt;400&gt; 74

```

atg gga ttc agc agg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gtg act aca ggt 48
Met Gly Phe Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly
-19          -15          -10          -5
gtc cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tcc gga gct gag gtg aag aag 96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          -1  1          5          10
cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          15          20          25
att aat tac aat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192
Ile Asn Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
          30          35          40          45
gag tgg atg gga gct att ttt cca gga aat ggt ttt act tcc tac aat 240
Glu Trp Met Gly Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn
          50          55          60
cag aag ttc aag ggc aga gtc acc att acc gtc gac aag tcc acg agc 288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
          65          70          75
aca gcc tac atg cag ctg cgc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
          80          85          90
tat ttc tgt gcg aga gat ggt gac tat tac ttt gac tac tgg ggc cag 384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
          95          100          105
gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca g 409
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110          115          117

```

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 75

```

caggaaacag ctatgacgaa ttccaccatg gattttcaag tgcagatttt cagcttcctg 60
ctaatacgtg cctcagtcac aatatcc 87

```

&lt;210&gt; 76

<211> 93  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 76  
aagtgatggg gacctctct cctacagatg cagacagga ggatggagac tgggtcatct 60  
ggatatctcc tctggatatt atgactgagg cac 93

<210> 77  
<211> 85  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 77  
agaggaggtc accatcactt gtagtgccag ctcgagtga agttacatgc actggtatca 60  
gcagaaacca gggaaagccc ctaag 85

<210> 78  
<211> 84  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 78  
atccactgcc gctgaacctt gatgggaccc cagaagccag gttggatgtt ctatagatca 60  
gaagcttagg ggctttccct gggt 84

<210> 79  
<211> 94  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 79

aaggttcagc ggcagtggat ctgggacatt ttatactetc accatcagca gcctgcagcc 60  
tgaagatttt gcaacttatt actgtcatca gtgg 94

<210> 80

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 80

gttttccag tcacgaccgt acgtttgatc tctaccttg tcccttgccc gaacgtgtac 60  
atactccact gatgacagta ataag 85

<210> 81

<211> 379

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(378)

<400> 81

atg	gat	ttt	caa	gtg	cag	att	ttc	agc	ttc	ctg	cta	atc	agt	gcc	tca	48
Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	
-22	-20					-15				-10						
gtc	ata	ata	tcc	aga	gga	gat	atc	cag	atg	acc	cag	tct	cca	tcc	tcc	96
Val	Ile	Ile	Ser	Arg	Gly	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	
-5				-1	1					5					10	
ctg	tct	gca	tct	gta	gga	gag	gag	gtc	acc	atc	act	tgt	agt	gcc	agc	144
Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Glu	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	
				15				20						25		
tgc	agt	gta	agt	tac	atg	cac	tgg	tat	cag	cag	aaa	cca	ggg	aaa	gcc	192
Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	
				30				35						40		
cct	aag	ctt	ctg	atc	tat	aga	aca	tcc	aac	ctg	gct	tct	ggg	gtc	cca	240
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	
		45					50					55				
tca	agg	ttc	agc	ggc	agt	gga	tct	ggg	aca	ttt	tat	act	ctc	acc	atc	288

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile  
60 65 70  
agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cat cag tgg 336  
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp  
75 80 85 90  
agt atg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gta gag atc aaa c 379  
Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
95 100

<210> 82  
<211> 138  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<223>

<400> 82  
Met Glu Trp Asn Trp Val Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Thr Ala Gly  
-19 -15 -10 -5  
Val Tyr Ala Gln Gly Gln Met Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys  
-1 1 5 10  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Pro Ser Gly Phe Thr Phe  
15 20 25  
Ser Ser Asn Tyr Ile Ser Trp Leu Lys Gln Lys Pro Gly Gln Ser Leu  
30 35 40 45  
Glu Trp Ile Ala Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn  
50 55 60  
Gln Lys Phe Thr Ala Lys Ala His Val Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser  
65 70 75  
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile  
80 85 90  
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Gly Asp Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp  
95 100 105  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
110 115 119

<210> 83  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<223>

&lt;400&gt; 83

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 -22 -20 -15 -10  
 Val Ile Ile Ser Arg Gly Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 -5 -1 1 5 10  
 Met Ser Ala Ser Gln Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
 15 20 25  
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
 30 35 40  
 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Pro Ser Gly Val Pro  
 45 50 55  
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 60 65 70  
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 75 80 85 90  
 Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 95 100 105 106

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 136

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 84

Met Gly Phe Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly  
 -19 -15 -10 -5  
 Val His Ser Gln Ala Phe Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg  
 -1 1 5 10  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 15 20 25  
 Ile Asn Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu  
 30 35 40 45  
 Glu Trp Ile Gly Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn  
 50 55 60  
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
 65 70 75  
 Thr Val Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 80 85 90  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 95 100 105



Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 110 115 117

<210> 85  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223>

<400> 85  
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 -22 -20 -15 -10  
 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 -5 -1 1 5 10  
 Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser  
 15 20 25  
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
 30 35 40  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 45 50 55  
 Phe Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile  
 60 65 70  
 Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp  
 75 80 85 90  
 Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 95 100 104

<210> 86  
 <211> 140  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 86  
 Met Glu Trp Asn Trp Val Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Thr Ala Gly  
 -19 -15 -10 -5  
 Val Tyr Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 -1 1 5 10  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 15 20 25

Ser Ser Asn Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45  
 Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn  
 50 55 60  
 Gln Lys Phe Thr Ala Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser  
 65 70 75  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 80 85 90  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Asp Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp  
 95 100 105  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 110 115 119

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 136

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

&lt;400&gt; 87

Met Gly Phe Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly  
 -19 -15 -10 -5  
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 -1 1 5 10  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 15 20 25  
 Ile Asn Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45  
 Glu Trp Met Gly Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn  
 50 55 60  
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
 65 70 75  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 80 85 90  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln 95  
 100 105  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 110 115 117

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 88

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
-22      -20                      -15                      -10
Val Ile Ile Ser Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
      -5              -1  1              5              10
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
              15              20              25
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
              30              35              40
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Pro Ser Gly Val Pro
              45              50              55
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
              60              65              70
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
              75              80              85              90
Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
              95              100              105 106

```

<210> 89

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 89

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
-22      -20                      -15                      -10
Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser
      -5              -1  1              5              10
Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Ser Ala Ser
              15              20              25
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
              30              35              40
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
              45              50              55
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
              60              65              70

```

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp  
 75 80 85 90  
 Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 95 100 104

<210> 90

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 90

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 -22 -20 -15 -10  
 Val Ile Ile Ser Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 -5 -1 1 5 10  
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser  
 15 20 25  
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
 30 35 40  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 45 50 55  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 60 65 70  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp  
 75 80 85 90  
 Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 95 100 104

<210> 91

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 91

Met Gly Phe Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly  
 -19 -15 -10 -5  
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 -1 1 5 10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
           15                                  20                                  25  
 Ile Asn Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
           30                                  35                                  40                                  45  
 Glu Trp Met Gly Ala Ile Phe Pro Gly Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn  
                                   50                                  55                                  60  
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
                                   65                                  70                                  75  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
                                   80                                  85                                  90  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
                                   95                                  100                                  105  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
           110                                  115                                  117

<210> 92

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Humanized antibody

<400> 92

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 -22       -20                                   -15                                   -10  
 Val Ile Ile Ser Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
           -5                                   -1     1                                   5                                   10  
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Glu Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser  
                                   15                                   20                                   25  
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
                                   30                                   35                                   40  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
                                   45                                   50                                   55  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile  
                                   60                                   65                                   70  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp  
           75                                   80                                   85                                   90  
 Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                                   95                                   100                                   104

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03957

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N 33/53, A61K 45/00, A61K 39/395 // C12N 15/06, C12N 15/12, C07K 16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N 33/53, A61K 45/00, A61K 39/395, C12N 15/06, C12N 15/12, C07K 16/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 98/22626, A (Kyowa Hakko Kogyo K.K.), 28 May, 1998 (28.05.98) & EP, 882799, A	21-31,43-65
Y	BIOSIS No.199799785097 & Sawano Asako et al., "The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of Flt-1 kinase is a major binding site for PLC-gamma." Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.238, No.2, pp.487-491 (1997)	21-31,43-65
Y	BIOSIS No.199799777801 & Waltenberger J et al., "Vascular endothelial growth factor stimulates monocyte activation and chemotaxis via the receptor tyrosine kinase Flt-1", European Heart J., Vol.18, (abstr.suppl), page 4, 1997	21-31,43-65
Y	BIOSIS No.199699135536 & Clauss Matthias et al., "The Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities", J.Biol.Chem., Vol.271, No.30, pp.17629-17634 (1996)	21-31,43-65
Y A	BIOSIS No.199698771458 & Barleon Bernhard et al., "Migration of human monocytes in response to vascular	21-31,43-65 1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
05 July, 2000 (05.07.00)Date of mailing of the international search report  
18 July, 2000 (18.07.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03957

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	endothelial growth factor is mediated via the VEGF receptor flt-1", Blood, Vol.87, No.8, pp.3336-3343 (1996)	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP00/03957

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 32-42  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The subject matter of claims 32-42 relates to a method for diagnosis of the human body.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> G01N 33/53, A61K 45/00, A61K 39/395 // C12N 15/06, C12N 15/12, C07K 16/28

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> G01N 33/53, A61K 45/00, A61K 39/395, C12N 15/06, C12N 15/12, C07K 16/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 98/22626, A (協和醸酵工業株式会社) 28.5月.1998 (28.05.98) & EP, 882799, A	21-31, 43-65
Y	BIOSIS No.199799785097 & Sawano Asako et al., 「The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of Flt-1 kinase is a major binding site for PLC-gamma.」 Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 238, No. 2, P. 487-491 (1997)	21-31, 43-65

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.07.00

国際調査報告の発送日

18.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一



2 J

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	BIOSIS No.199799777801 & Waltenberger J et al., 「Vascular endothelial growth factor stimulates monocyte activation and chemotaxis via the receptor tyrosine kinase Flt-1」 European Heart J., Vol. 18(abstr. suppl)P4, 1997	21-31, 43-65
Y	BIOSIS No.199699135536 & Clauss Matthias et al., 「The Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities」 J. Biol. Chem., Vol. 271, No. 30, P. 17629-17634 (1996)	21-31, 43-65
Y/A	BIOSIS No.199698771458 & Barleon Bernhard et al., 「Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor is mediated via the VEGF receptor flt-1」 Blood, Vol. 87, No. 8, P. 3336-3343 (1996)	21-31, 43-65 /1-20

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 32-42 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
  
人の診断方法に関する。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみにについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。